

**Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler**

Bedeutung der microRNA-146a im Krankheitsbild der Sepsis

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Julia Valeria Braunbeck
geborene Sedlbauer
aus Aichach
2019**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. med. Simone Kreth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hoffmann
PD Dr. Christian Schneider

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2019

0 Gliederung

0	GLIEDERUNG	I
1	EINLEITUNG	1
2	FRAGESTELLUNG	4
3	METHODEN	5
3.1	Patienten	5
3.2	Zellkulturen	5
3.2.1	Zelllinie HEK-293	6
3.2.2	Zelllinie Jurkat.....	6
3.2.3	Primäre humane T-Lymphozyten	6
3.2.4	Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität.....	8
3.3	Transfektion durch Elektroporation	8
3.4	RNA Gewinnung	9
3.4.1	RNA Gewinnung mittels RNAqueous RNA Isolation Kit.....	9
3.4.2	RNA Gewinnung mittels mirVana™ miRNA Isolation Kit	10
3.5	Reverse Transkription der RNA in cDNA	10
3.6	Quantitative Real-time PCR	11
3.6.1	Quantitative Real-time PCR mit Universal-ProbeLibrary-Sonden (mRNA Expression)	11
3.6.2	TaqMan® microRNA-146a Assay (miRNA Expression).....	12
3.7	Gelelektrophorese	14
3.8	Westernblot	14
3.9	Isolation von DNA	15
3.9.1	Plasmid Gewinnung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit	15
3.9.2	Plasmid Gewinnung mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System.....	16
3.10	Klonierung des 3'UTR der PRKCε	17
3.10.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des 3'UTR der PRKCε	17
3.10.2	Ligation des 3'UTR der PRKCε in Strata Clone Blunt Vector und Transformation in StrataClone SoloPack Competent Cells	18

Gliederung

3.10.3	Selektion positiver Klone	19
3.10.4	Gewinnung des SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmids	19
3.11	Klonierung des PRKCϵ-Reporterplasmids psiCheckTM-2 Vectors	19
3.11.1	Restriktionsverdau des SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmids und des psiCheck TM -2 Vectors..	20
3.11.2	Aufreinigung des 3'UTR der PRKC ϵ und des geschnittenen psiCheck TM -2 Vectors	20
3.11.3	Ligation des 3'UTR der PRKC ϵ mit dem psiCHECK TM -2 Vector.....	20
3.11.4	Gewinnung des PRKC ϵ -Reporterplasmids	21
3.12	Mutagenese des PRKCϵ-Reporterplasmids	21
3.12.1	Verdau der parentalen DNA.....	22
3.12.2	Transformation der mutierten PRKC ϵ -Reporterplasmide	22
3.12.3	Gewinnung des PRKC ϵ -Reporterplasmids	22
3.13	Luciferasemessung von transfizierten HEK-Zellen.....	23
4	RESULTATE.....	25
4.1	Die Expression von miRNA-146a wird in humanen T-Zellen durch Aktivierung verstärkt, ist jedoch bei septischen Patienten vermindert	25
4.2	Die miRNA-146a übt einen hemmenden Einfluss auf die Th1-Zelldifferenzierung aus	26
4.3	STAT4 fördert die Th1-Zelldifferenzierung und wird über die miRNA-146a indirekt beeinflusst	29
4.4	Die miRNA-146a bindet direkt an PRKC ϵ und vermindert darüber die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT4	33
4.5	Der Einfluss der miRNA-146a auf die Aktivierung von STAT 4 über die direkte Hemmung der PRKC ϵ spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis	39
5	DISKUSSION.....	40
6	AUSBLICK	47
7	ZUSAMMENFASSUNG	50
8	SUMMARY	51
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	52

Gliederung

10 ANHANG	I
10.1 Reagenzien	I
10.2 Assays und Kits	V
10.3 Geräte	VII
10.4 Verbrauchsmaterialien	VIII
10.5 Puffer und Medien	X
10.6 Primersequenzen	XI
10.7 Small interfering RNA	XIV
10.8 Universal ProbeLibrary Set, Human von Roche Diagnostics GmbH	XIV
10.9 Software	XV
10.10 Probenmaterial	XV

1 Einleitung

Die Sepsis ist ein lebensbedrohliches Krankheitsbild, das trotz vieler aufwändiger Behandlungsmöglichkeiten in einem von vier Fällen zum Tode führt [1]. Sie ist definiert als „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS), das durch Infektion hervorgerufen wird [2, 3]. Zur lokalen Abwehr von Mikroorganismen und um eine generalisierte Streuung pathogener Keime zu verhindern löst der Körper über ein komplexes Netzwerk von Regulationsmechanismen eine Immunantwort aus [4, 5]. Im Falle der Sepsis durchläuft das Immunsystem anfangs eine überschießende Aktivierung von Immunzellen mit starker Inflammation [6]. Diese frühe Immunabwehr wird durch aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt und führt zu einer übermäßigen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie vermehrte Expression von co-stimulatorischen Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen und Phagozyten. Hierdurch werden T-Lymphozyten als zentrale Vermittler der adaptiven Immunantwort aktiviert. Diese Flut von Zytokinen ist für die meisten Symptome der Sepsis verantwortlich, wie Fieber, hyperdynamische Kreislaufsituation bis hin zum Schock sowie gestörte Mikrozirkulation die zu Gewebeschaden bis hin zur generalisierten Organdysfunktion führt [7]. Wird dieser hyperinflammatorische Beginn überlebt, folgen antiinflammatorische, immunsuppressive Reaktionen die unter dem Begriff Compensatory Anti-inflammatory response-Syndrom (CARS) zusammen-gefasst werden. In der Sepsis sind sie durch Freisetzung endogener antiinflammatorischer Mediatoren sowie Apoptose und Dysregulation von T-Lymphozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems charakterisiert. Meist unverhältnismäßig stark ausgeprägt können sie so zu einem immunparalytischen Zustand führen mit vermehrter Anfälligkeit des Organismus für Sekundärinfektionen, die für die meisten Todesfälle bei Sepsis verantwortlich sind [8]. Hyper- und hypoinflammatorische Phase der Sepsis können zeitlich überlappen oder auch mehrfach durchlaufen werden. Wie stark die jeweilige Phase ausgeprägt ist, hängt von individuellen Faktoren des Patienten ab. Zum Beispiel ist eine vorrangige T-Helfer (Th) 1 - Zellantwort ein positiver Faktor für das Überleben [6, 9].

Einleitung

T-Lymphozyten spielen eine essentielle Rolle in der Immunantwort. Sie werden in zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten und CD4⁺ T-Helfer-Zellen unterteilt, die in funktionell unterschiedliche Subpopulationen differenzieren können. Hierzu gehören Th1-Zellen die v.a. für die Eliminierung von intrazellulären Keimen verantwortlich sind [10]. Sie sezernieren inflammatorische Zytokine, unter anderem Interferon gamma (IFN- γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 2 (IL-2) [6]. Dagegen sind Th2-Zellen eher für die Bekämpfung von Parasiten zuständig [10]. Sie setzen Zytokine mit antiinflammatorischer Wirkung frei, wie zum Beispiel IL-4 und IL-10 [6]. Regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) werden primär eine immun-supprimierende Funktion zugeschrieben. Das Immunsystem benötigt zusätzlich Th17-Zellen, um Mikroorganismen zu eliminieren, die nicht von Th1- oder Th2-Zellen erkannt werden. Sie produzieren v.a. IL-17, IL-21 sowie IL-22 und induzieren die Synthese von IL-6 und TNF- α mit überwiegend proinflammatorischer Wirkung [10-13]. Die adaptive Immunantwort lässt sich am Anfang der Sepsis als eine Th1-Zellantwort beschreiben. Während es im weiteren Verlauf zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts hin zur Th2 Antwort mit ausgeprägter T-Zell Apoptose kommt, die zu einem immunsuppressiven Stadium führen kann [10, 14].

Trotz intensiver Forschung ist der Mechanismus der Fehlregulation der T-Zellantwort und die Pathophysiologie der Sepsis kaum verstanden. Die Sepsis ist ein heterogenes, dynamisches Syndrom, das durch Störung des Gleichgewichts im „Inflammatorischen Netzwerk“ verursacht wird [10].

Das Verständnis der Entwicklung des Immunsystems und die Regulation der Immunantwort hat sich in den letzten Jahren durch die Entdeckung von microRNAs (miRNA) gewandelt [15]. MiRNAs sind kurze, doppelsträngige, nicht kodierende RNA Moleküle mit einer Länge von 19 bis 23 Nukleotiden [16]. Sie kontrollieren die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene [15], indem sie ihre Ziel-„messenger“ RNA (mRNA) an komplementären Bindestellen in der 3' untranslatierten Region (UTR) binden [17]. Hierüber wird entweder der Abbau der mRNA eingeleitet oder ihre Translation gehemmt. Über 30% aller Protein-kodierenden Gene werden durch miRNAs beeinflusst. Zurzeit sind über 1800 miRNAs in menschlichen Zellen bekannt. Es wurde gezeigt, dass miRNAs eine Schlüsselrolle in einer großen Anzahl von biologischen Prozessen spielen, unter anderem in der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass viele

Einleitung

menschliche Erkrankungen mit einer veränderten miRNA Expression einhergehen, wie zum Beispiel Tumoren oder entzündliche Erkrankungen [15, 18]. Die Erforschung von miRNAs und ihrer Funktionen eröffnen viele neue Möglichkeiten für Diagnose und Therapie vieler Erkrankungen.

Auch zentrale Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort werden durch miRNAs reguliert. Das komplexe Regulationsnetzwerk des Immunsystems ist auch hinsichtlich der miRNAs noch nicht aufgeklärt [19-21]. Dies gilt vor allem für ihre Rolle bei der Regulation des „Inflammatorischen Netzwerks“ im Krankheitsbild der Sepsis.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss miRNAs auf das Krankheitsbild der Sepsis haben und welche therapeutischen Strategien sich später daraus ergeben könnten. Hierbei stehen vor allem die möglichen Angriffspunkte von miRNAs in den Regulationsmechanismen der adaptiven Immunantwort im Vordergrund.

2 Fragestellung

In der Arbeitsgruppe wurde als Vorarbeit zu der Frage, welche miRNAs im Krankheitsbild der Sepsis von Interesse sein könnten, ein miRNA-Array durchgeführt, das die Expression aller bis dato bekannter miRNAs in T-Zellen bei Sepsis versus Gesund untersuchte. Eine der hierbei gefundenen miRNAs mit signifikant verminderter Expression in T-Zellen von septischen Patienten im Vergleich zu Gesunden ist die miRNA-146a.

Die vorliegende Arbeit sollte das Ergebnis des Arrays validieren und untersuchen, welche Rolle die miRNA-146a in menschlichen T-Zellen im Krankheitsbild der Sepsis spielen könnte. Im Einzelnen sollten dabei die folgenden Fragen bearbeitet werden: 1. Welchen Einfluss hat die miRNA-146a auf die Zellfunktion der T-Zellen von an Sepsis erkrankten Patienten und 2. über welche Signalwege wird dies vermittelt.

3 Methoden

Für die Benutzung der angeführten Produkte wurden die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt. Alle benutzten Materialien und Geräte sind mit Herstellerverweis im Anhang aufgeführt.

Nuklease-freies Wasser wurde mit dem Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System gewonnen.

Die Signifikanz wurden bei Normalverteilung mit dem T-Test bei Nicht-Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-U Test überprüft.

3.1 Patienten

Von zehn Patienten (Alter $62 \pm 16,2$ Jahre, 5 männlich, 5 weiblich) wurden Blutproben gewonnen, innerhalb von 48 Stunden nach der klinischen Diagnose einer akuten Sepsis oder eines septischen Schocks, nach den Kriterien der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz [2], unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache (SOFA Score $11,3 \pm 5,4$). Die Blutproben wurden vor der Gabe von Antibiotika oder Kortikosteroiden gewonnen. Patienten mit aktueller oder zurückliegender Kortikosteroidtherapie oder mit einer malignen Erkrankung wurden von der Studie ausgeschlossen. Die schriftliche Einwilligung der Patienten oder eines legalen Bevollmächtigten wurde eingeholt. Die Zustimmung des zuständigen Ethikkomitees, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München (No.107-11) und des Universitätsklinikums Jena (No.2007-004333-42, lokal zuständige Ethikkommission des Klinikums der Universität München 2242-03/08) lag vor.

3.2 Zellkulturen

Die Arbeiten an Zellkulturen wurden in einer Steril Werkbank, Typ HS 12/2 von Heraeus Instruments, durchgeführt. Alle Zellen wurden in Inkubationsschränken bei 37 °C und $5\% \text{ CO}_2$ in 25T- oder 75T-Zellkulturflaschen inkubiert.

Methoden

Die Zellen wurden täglich im Lichtmikroskop auf regelrechtes Wachstum und Keimfreiheit untersucht, bei Bedarf mit neuem Medium versorgt und in neue Zellkulturflaschen passagiert.

Gearbeitet wurde mit den Zelllinien Jurkat und HEK-293 sowie mit primären Pan T-Zellen, primären CD4+T-Zellen und differenzierten humanen T-Zellen.

3.2.1 Zelllinie HEK-293

„Human Embryonic Kidney“-Zellen (HEK) sind menschliche embryonale Nierenzellen. Sie wurden durch die Transformation mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus 5 immortalisiert.

HEK-Zellen sind adhärente Zellen und wurden mit Trypsin/EDTA Solution gelöst. Kultiviert wurde die Zelllinie in Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Vollmedium, bestehend aus DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertes Fetal Calf Serum (FCS), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Non-essential amino acids (NEAA).

3.2.2 Zelllinie Jurkat

Jurkat Zellen sind humane T-Zell Leukämiezellen. Es sind Suspensionszellen. Kultiviert wurden sie in Roswell Park Memorial Institute Vollmedium bestehend aus RPMI-Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% HEPES.

3.2.3 Primäre humane T-Lymphozyten

Primäre humane T-Lymphozyten sind Suspensionszellen. Kultiviert wurden sie in RPMI-Vollmedium. Gearbeitet wurde mit Pan T-Zellen (CD8+ und CD4+) und CD4+ T-Zellen.

3.2.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen mittels Ficollgradient

Für die Gewinnung humaner T-Lymphozyten wurde venöses, mit Lithium Heparin antikoaguliertes Blut freiwilliger, gesunder Probanden mittels HISTOPAQUE®-1077 (Histopaque) aufgereinigt. In Mikrobiologieröhrchen wurden 3 ml Histopaque vorgelegt, vorsichtig mit 3 ml venösem Blut überschichtet und 15 Minuten bei 3.000 rpm und 24 °C zentrifugiert.

Durch den Dichteunterschied, durch Aggregation der Polysaccharose mit Erythrozyten und durch Hypertonisierung der Granulozyten sammeln sich diese am

Boden unter der Histopaque Schicht. An der Grenzfläche zwischen dem Plasma und dem darunter liegenden Histopaque sammeln sich die mononukleären Zellen, d.h. vor allem Monozyten und Lymphozyten. Die mononukleären Zellen wurden abpipettiert, zweimal mit Hank'sche Lösung ohne Phenolrot (HBSS) gewaschen, wodurch sie von Histopaque und Thrombozyten gereinigt wurden und anschließend gezählt. Nach erfolgreicher Zellzählung wurden die Zellen nochmals 10 Minuten mit 1200 rpm bei 24 °C mit HBSS gewaschen.

3.2.3.2 Gewinnung primärer humaner Pan (CD8+ und CD4+) T-Zellen und primärer humaner CD4+T-Zellen

Um Pan T-Zellen bzw. CD4+T-Zellen aus mononukleären Zellen zu separieren, wurde eine Negativselektion durchgeführt. Alle anderen Zellen wurden indirekt magnetisch markiert und anschließend negativ selektioniert.

Hierfür wurden Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper gegen Oberflächenproteine verwendet, an die MicroBead-konjugierte monoklonale Antikörper gegen Biotin binden. (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und Glykophorin A, MACS® Pan T Cell Isolation Kit II und zusätzlich gegen CD8 und TCR γ/δ bei Verwendung des MACS® CD4+T Cell Isolation Kit II). Zusätzlich binden tote Zellen unspezifisch an die MicroBeads der monoklonalen Antikörper.

Pro zehn Millionen mononukleärer Zellen wurden 40 μ l Puffer A (MACS™ BSA Stock solution und autoMACS™ rinsing solution, Verdünnung 1:20) und 10 μ l Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper verwendet. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden pro zehn Millionen mononukleärer Zellen 30 μ l Puffer A und 20 μ l MicroBead-konjugierte monoklonale Anti-Biotin Antikörper benötigt und die Zellen wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Puffer A 10 Minuten mit 1200 rpm gewaschen und in 500 μ l Puffer A resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mit Puffer A prä-equilibrierte MACS® Separation Columns LS gegeben und in das Magnetfeld des dafür vorgesehenen Quadro MACS® Separator gestellt.

Durch das Magnetfeld konnten die nicht markierten Pan T-Zellen bzw. CD4+T-Zellen ungehindert durch die MACS® Separation Columns fließen und in einem neuen Mikrobiologieröhrchen aufgefangen werden, während alle markierten Zellen, auch tote, durch die magnetische Anziehung am Durchfluss gehindert wurden.

Anschließend wurden die MACS® Separation Columns dreimal mit Puffer A nachgespült, um möglichst viele Pan T-Zellen bzw. CD4+T-Zellen zu erhalten.

3.2.3.3 Expandierung primärer T-Zellen

Fünf Millionen primäre T-Zellen (von gesunden Probanden) wurden in 10 ml RPMI Vollmedium kultiviert. Sie wurden mit 30 U/ml humanem rekombinatem IL-2 und 25 µl Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 pro eine Million Zellen stimuliert. Diese wurden vorher mit „phosphate buffered saline“ (PBS) im DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator gewaschen. Nach fünf bis sechs Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen gezählt.

3.2.3.4 Differenzierung expandierter T-Zellen zu Th1-Zellen

Fünf Millionen expandierte T-Zellen wurden in 10 ml RPMI Vollmedium kultiviert. Stimuliert wurden sie mit 30 U/ml humanem rekombinanten IL-2, 25 µl CD3/CD28 Stimulationsbeads pro eine Million Zellen, 5 ng/ml humanem rekombinanten IL-12 und 10 µg/ml anti-rIL-4 Antikörper. Die Zellen wurden fünf bis sechs Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.4 Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität

Vor dem Zählen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Um mit einer bestimmten Anzahl von Zellen arbeiten zu können, wurden die Zellen mit dem Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer gezählt. Dieser färbt mittels Trypanblau die toten, permeablen Zellen und Zelltrümmer. Vitale Zellwände werden nicht angefärbt. Anschließend wird die Zellsuspension durch eine Mikroskop-Durchflusskammer geleitet. Eine CCD-Kamera nimmt Bilder auf, die mittels digitaler Bildanalyse ausgewertet werden. Die Zellen werden in Graustufen eingeteilt. Dunkle, angefärbte Zellen werden als tot eingestuft, helle, nicht-angefärbte Zellen als lebend. Die Viabilität wird aus dem Verhältnis ungefärbter Zellen zur Gesamtzahl bestimmt.

3.3 Transfektion durch Elektroporation

Zu transfizierende Zellen wurden gezählt, anschließend mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert, um eine Zellsuspension mit möglichst wenigen Elektrolyten zu erhalten. CD3/CD28 Stimulationsbeads mussten vor dem Zählen entfernt werden. Transfiziert wurde mit dem Neon™ Transfection System, das die Neon™ Tips

Methoden

Pipettenspitzen mit Goldelektrode als Elektroporationskammer benutzt, wodurch der Abstand der Elektroden maximiert und gleichzeitig die Oberfläche der Elektroden minimiert wird. Es entsteht ein möglichst gleichförmiges elektrisches Feld mit möglichst geringer pH Änderung, Ionen- und Hitzeentstehung.

Die Versuche wurden in Triplikaten angelegt und jeweils mit Negativkontrollen validiert. Mit dem Neon™ Transfection System 10 µl Kit und Puffer R wurden HEK-Zellen für Luciferasemessungen transfiziert. Pro Well (12-Well Platte) wurden 100.000 HEK-Zellen, 50 nM synthetischer Präkursor von miRNA-146a oder „non coding“ miRNA (miR-146a bzw. miR-NC) oder 50 nM „small interfering“ RNA (siRNA) (gegen Proteinkinase C epsilon (PRKCε) bzw. „Non-Targeting“ siRNA (siNC)) und 1 µg DNA (PRKCε-Reporterplasmid mit 3'UTR bzw. mutiertem 3'UTR von PRKCε (siehe 3.11, 3.12)) oder 0,8 µg „Signal transducer and activator of transcription“ (STAT) 4-Luciferase-Reporter mit 0,3 µg Renilla Kontrollreporter (siehe 3.13), transfiziert (1 ml Endvolumen). Dieser Ansatz wurde für 40 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Transfiziert wurde mit zwei Pulsen von 20 Millisekunden bei 1150 Volt.

Jurkat Zellen, primäre (Pan und CD4+) und differenzierte T-Zellen wurden mit Hilfe des Neon™ Transfection System 100 µl Kit und Puffer R (Jurkat) bzw. Puffer T (T-Zellen) transfiziert. Pro Well (6-Well Platte) wurden 2 Millionen Zellen, 50 nM miR (miR-146a bzw. miR-NC), antimiR (antimiR-146a bzw. antimiR-NC) oder siRNA (siPRKCε bzw. siNC) transfiziert (2 ml Endvolumen pro Well) und für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. T-Zellen wurden mit einem Puls von 20 Millisekunden bei 2100 Volt transfiziert. Jurkat Zellen wurden mit einem Puls von 20 Millisekunden bei 1800 Volt transfiziert. Vier bis sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 25 µl CD3/CD28 Stimulationbeads pro Well stimuliert.

3.4 RNA Gewinnung

3.4.1 RNA Gewinnung mittels RNAqueous RNA Isolation Kit

RNA wurde mittels RNAqueous RNA Isolation Kit gewonnen. Hierfür wurden je 2 Millionen transfizierte primäre Pan, CD4+ oder differenzierte T-Zellen in 300 µl Lysis/Binding Solution gelöst. Durch das darin enthaltene Guanidinium-Salz werden die Zellen aufgeschlossen und endogene RNAsen inaktiviert.

Methoden

Das Lysat wurde mit 300 µl 64% Ethanol vermischt, um die im Lysat enthaltene RNA bindefähig für Glasfasern zu machen. Anschließend wurde das Lysat durch die im Kit enthaltenen Glasfaserfilter filtriert. Um die am Filter haftende RNA von Verunreinigungen zu befreien, wurde der Filter einmal mit 700 µl Wash Solution 1 und zweimal mit 500 µl Wash Solution 2/3 gewaschen. Schließlich wurde die RNA mit 30 µl 75 °C warmer Elutionslösung vom Filter gelöst.

DNA-Verunreinigungen wurden im Folgenden mit dem Turbo DNA-free™ Kit durch eine DNase entfernt (Inkubation bei 37 °C, 30 Minuten). Die DNase wurde durch das Inaktivierung Reagent inaktiviert (5 Minuten, Raumtemperatur). Durch Zentrifugation sammelte sich das Inaktivierung Reagent am Boden. Der RNA haltige Überstand wurde in ein neues Reagenzröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Durch ein Spektralphotometer (Nano Drop 2000) wurde die jeweilige RNA Konzentration bestimmt.

3.4.2 RNA Gewinnung mittels mirVana™ miRNA Isolation Kit

RNA für quantitative Bestimmung von miRNA Level wurde mittels mirVana™ miRNA Isolation Kit isoliert. Durchführung siehe Herstellerangaben. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.5 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Je 1 µg RNA (falls weniger, dann gleiche Menge) wurde durch Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zunächst wurde die RNA mit 0,4 µg Oligo-dTPPrimer, 0,4 µg Random Hexamers und 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) bei 65 °C für 5 Minuten denaturiert. Es folgte eine einminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 4 µl 5 x First-Strand Buffer, 0.1 M DTT, 40 U RNaseOut™ und 200 U SuperScript™ III Reverse Transcriptase zugegeben. Es folgten das Annealing (25 °C, 5 Minuten), die cDNA-Synthese (50 °C, 45 Minuten) sowie eine abschließende Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C. Durch den RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor wurde die umzuschreibende mRNA vor Abbau durch Ribonukleasen geschützt, was eine bessere cDNA Ausbeute ermöglicht. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.6 Quantitative Real-time PCR

Durch die quantitative Real-time „Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR) kann die in einer Probe enthaltene RNA-Menge relativ zum Referenzgen bestimmt werden. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung von Fluoreszenzsignalen in der exponentiellen Phase der PCR, nach der Überschreitung der Hintergrundfluoreszenz am sog. Crossing Point bzw. Cycle Threshold. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Menge des amplifizierten Templates.

Alle Experimente wurden mit dem Light Cycler® 480 und den Light Cycler® 480 Multiwell Plates von Roche Diagnostics GmbH durchgeführt und die relative mRNA bzw. miRNA Expression (zur Expression des jeweiligen Referenzgens normalisierte mRNA Expression der untersuchten Zielgene bzw. die relative miRNA-146a Expression) unter Verwendung der Light Cycler® 480 Relative Quantification Software effizienzkorrigiert bestimmt.

3.6.1 Quantitative Real-time PCR mit Universal-ProbeLibrary-Sonden (mRNA Expression)

Die relative mRNA Expression potentieller Zielgene wurde durch qRT-PCR mit Universal-ProbeLibrary (UPL)-Sonden (Roche Diagnostics GmbH) quantifiziert. Hierbei wird das Fluoreszenzsignal nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) generiert. Die Sonden besitzen am 5'-Ende Fluorescein und am 3'-Ende einen Dark Quencher. Die Fluoreszenz des Fluoresceins wird durch den Dark Quencher verhindert, indem er die Energie des Fluoresceins aufnimmt. Hybridisieren die Primer spezifisch an dem zu untersuchenden cDNA Teil, wird der Primer durch die FastStart Taq DNA-Polymerase (FastStart Essential DNA Probes Master) abgebaut. Fluorescein wird vom Dark Quencher getrennt, wodurch es wieder fluoreszieren kann.

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels sequenzspezifischer Primer (Metabion GmbH, siehe Tabelle 6.2) jeweils in Doppelbestimmungen für die Zielgene PRKC ϵ , IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, STAT4 sowie für die Referenzgene SDHA und TBP.

20 µl Ansatz mit jeweils 10 ng/Well cDNA:

- 5 µl cDNA (10 ng/Well)
- 4,4 µl H₂O
- Je 0,2 µl Primer
- 0,2 µl Sonde
- 10 µl Probes Master

PCR-Bedingungen:

- Initial: 10 Minuten bei 95 °C
- Amplifikation in 50 Zyklen: 10 Sekunden Denaturieren (95 °C), 30 Sekunden Annealing (60 °C), 1 Sekunde Elongation (72 °C)
- Final: 30 Sekunden bei 40 °C

3.6.2 TaqMan® microRNA-146a Assay (miRNA Expression)

Mit Hilfe eines TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) können miRNAs durch eine qRT-PCR erkannt und quantifiziert werden. Das Fluoreszenzsignal wird mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) erzeugt. Die TaqMan®-MGB-Sonden besitzen am 5'-Ende Fluorescein und am 3'-Ende einen nichtfluoreszierenden Dark Quencher, einen sogenannten Minor Groove Binder (MGB), welcher gebundene Sonden am DNA-Strang stabilisiert und damit die Verwendung kürzerer Sondensequenzen erlaubt. Bei intakter Sonde wird das Reporter-Fluoreszenzsignal durch den Dark Quencher unterdrückt. Erst nach Spaltung der Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase werden Fluorescein und Quencher getrennt, so dass ein Lichtsignal detektiert werden kann.

Das Vorkommen der miRNA-146a in primären humanen Pan T-Zellen von Sepsis Patienten und gesunden Probanden wurde mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Systems bestimmt. Die zu untersuchende RNA wurde durch das mirVana™ miRNA Isolation Kit gewonnen. Zunächst wurde eine Reverse Transkription mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit durchgeführt. Hierbei wurden durch Verwendung spezifischer Primer nur die miRNA-146a und die Kontrolle U47 in cDNA umgeschrieben.

Methoden

7,5 µl Ansatz mit jeweils 10 ng RNA:

- 0,075 µl dNTP (1 mM)
- 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (25 U)
- 0,75 µl 10 x Reverse Transcription Buffer
- 0,095 µl RNase Inhibitor (1,9 U)
- 0,58 µl H₂O
- Je 1,5 µl Primer
- 5 µl RNA (2 ng/µl)

5 Minuten Inkubation auf Eis.

PCR-Bedingungen:

- Annealing: 16 °C, 30 Minuten
- cDNA-Synthese: 42 °C, 30 Minuten
- Final: 85 °C, 5 Minuten

Anschließend wurden die Proben durch eine qRT-PCR mit dem TaqMan® MicroRNA Assay (für Homo sapiens (hsa-)miRNA-146a und die Kontrolle U47) quantifiziert.

20 µl Ansatz:

- 1,33 µl cDNA
- 10 µl FastStart Essential DNA Probes Master
- 7,67 µl H₂O
- 1 µl TaqMan® MicroRNA Assay

PCR-Bedingungen:

- Initial: 95 °C, 10 Minuten
- Amplifikation in 50 Zyklen: 15 Sekunden Denaturieren (95 °C), 60 Sekunden Annealing und Elongation (60 °C)
- Final: 40 °C für 30 Sekunden

3.7 Gelelektrophorese

Gelelektrophoresen wurden mit 1% Agarose in Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE Puffer) und 7,5 ng/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Die Proben wurden mit 6 x DNA Loading Dye angefärbt. Als Größenstandard wurde GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für 40 Minuten. Der Nachweis der DNA wurde unter UV-Licht ermittelt (E-BOX VX2 Geldokumentationssystem).

3.8 Westernblot

Für den Nachweis von PRKC ϵ , STAT4, Phospho-STAT4 und Phospho-STAT1 auf Proteinebene wurden Westernblot Analysen durchgeführt.

Der zu untersuchende Gesamtproteinextrakt wurde aus transfizierten (miR-146a bzw. miR-NC), humanen, primären Pan (CD8+ und CD4+) T-Zellen mittels Cell Lysis Buffer (Cell Signalling Technologies) gewonnen. Je 2 Millionen Zellen wurden mit PBS gewaschen (3 Minuten, 1500 rpm) und in 300 μ l 1 x Cell Lysis Buffer (mit Protease-Inhibitoren) gelöst. Das Zelllysate wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert, zweimal 30 Sekunden auf dem Vortexschüttler REAX 2000 gemischt und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4 °C. Der Überstand entsprach dem Proteinextrakt. Die Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (Bradford-Reagenz: BioRad).

Je 50 μ g Gesamtproteinextrakt wurden mit SDS-Probenpuffer (0,1 M Tris-HCl, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 1% β -Mercaptoethanol) versetzt und für 3 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, um Proteinmonomere zu erhalten. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem zehnprozentigen Polyacrylamidgel bei 25 mA pro Gel und 300 V für 90 Minuten. Es folgte der Proteintransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran bei 25 V pro Gel und 300 mA für 90 Minuten.

Die Membran wurde eine Stunde in 5% Magermilchpulver in PBST inkubiert, um überflüssige Antikörperbindestellen abzusättigen.

Die zu untersuchenden Proteine wurden durch Primärantikörper markiert. Das Protein PRKC ϵ (82 kDa) wurde mit einem Anti-PRKC ϵ monoklonalen Rabbit IgG Antikörper (Verdünnung 1:1.000) markiert, STAT4 mit einem Anti-STAT4 monoklonalen Mouse

Methoden

IgG Antikörper (Verdünnung 1:1.000), Phospho-STAT4 mit einem Anti-Phospho-STAT4 monoklonalen Rabbit IgG Antikörper (Verdünnung 1:500) und Phospho-STAT1 mit einem Anti-Phospho-STAT1 monoklonalen Mouse IgG Antikörper (Verdünnung 1:1.000). Als Lade-Kontrolle diente β -Aktin (42 kDa) (Anti-beta-Actin monoklonaler Mouse IgG Antikörper; Verdünnung 1:50.000).

Nach Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C wurde diese zweimal mit 1% Milchpulver in PBST 15 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte schließlich durch Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper, gelöst in 1% Milchpulver in PBST. PRKC ϵ und Phospho-STAT4 wurden hierbei mittels Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper (Verdünnung 1:2.000), STAT4, Phospho-STAT1 und β -Aktin wurden hingegen mittels Anti-Mouse IgG HRP-linked Antikörper (Verdünnung 1:10.000) sichtbar gemacht. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten mit 1% Tween 20 in PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Durch die konjugierte Meerrettich-Peroxidase der Sekundärantikörper konnten die gebundenen Proteine durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Als Substrat für die HRP wurde das 20 X LumiGLO® Reagent und 20 X Peroxide verwendet. Die HRP wandelt Luminol in ein Dianion um, welches durch Peroxid oxidiert wird. Das angeregte oxidierte Luminol Dianion emittiert beim Übergang in den Grundzustand Photonen. Die Photonenemission ist proportional zur Menge der vorhandenen Peroxidase, die wiederum von der Menge des gebundenen Proteins abhängt. Das emittierte Licht wurde auf einem Röntgenfilm aufgenommen. Die Proteinexpressions-Unterschiede zwischen zwei Extrakten wurden durch den Intensitätsunterschied der Röntgenfilmaufnahme bestimmt.

3.9 Isolation von DNA

3.9.1 Plasmid Gewinnung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Geringe Mengen an Plasmid-DNA wurden durch das QIAprep Spin Miniprep Kit gewonnen.

Von je einem Klon wurde eine Kultur in 3 ml LB-Medium mit 1 mg/ml Ampicillin angelegt und 16 - 20 Stunden bei 37 °C und 225 rpm in einem Kompaktthermoschüttler inkubiert.

Methoden

Von dieser Bakterienkultur wurde ein Glycerolstock angelegt (500 µl Glycerol 80%, 500 µl Bakterienkultur, bei -80 °C gelagert). Dieser wurde für die spätere Midiprep benötigt (siehe 3.9.2).

2 ml der gleichen Bakterienkultur wurden 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit RNAse A-haltigem Puffer (250 µl Buffer P1) resuspendiert. Unter alkalischen Bedingungen, die die DNA und Proteine reversibel denaturierten (250 µl NaOH- und SDS-haltiger Buffer P2), wurden die Zellen lysiert. Mit der Zugabe des hoch salzhaltigen Buffers N3 (350 µl) wurde die Zellsuspension neutralisiert sowie alle Zellbestandteile ausgefällt. Nur die im Verhältnis kleinere Plasmid-DNA renaturierte in der pH-neutralen Umgebung. Diese Lösung wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA durch eine Kieselsäuremembran filtriert. Die Plasmid-DNA, die in hoch salzhaltigem Buffer gelöst war, band an die Membran. Anschließend wurden enthaltene Endonukleasen in einem ersten Waschschrift entfernt (500 µl Buffer PB, 1 Minute 13.000 rpm). In einem zweiten Waschschrift wurden die Salze entfernt (750 µl Buffer PE, 1 Minute 13.000 rpm). Die Plasmid-DNA löste sich in salzarmer Umgebung von der Kieselsäuremembran und wurde schließlich in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert (1 Minute Inkubation, 1 Minute 13.000 rpm).

Am Nano Drop 2000 wurde die Plasmid-Konzentration bestimmt.

3.9.2 Plasmid Gewinnung mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System

Große DNA-Mengen wurden durch das PureYield™ Plasmid Midiprep System gewonnen.

1 µl des zuvor angelegten Glycerolstocks wurde in 3 ml Lysogeny Broth Medium (LB-Medium) mit 1 mg/ml Ampicillin kultiviert und 8 Stunden bei 37 °C und 225 rpm in einem Kompaktthermoschüttler inkubiert.

1 ml dieser Kultur wurde anschließend in 100 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt. 100 ml der Bakterienkultur wurden 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert.

Das Isolationsprinzip der Midiprep ist identisch zur Miniprep (siehe 3.9.1).

Methoden

Mit RNase A-haltigem Buffer (3 ml Resuspension Solution) wurde das Zellpellet resuspendiert. Durch 3 ml NaOH- und SDS-haltige Cell Lysis Solution wurden die Zellen lysiert.

Mit der Zugabe der Neutralization Solution (5 ml) wurde die Zellsuspension neutralisiert und ausgefällt. Diese Lösung wurde 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch eine Kieselsäuremembran mittels Vakuumpumpe filtriert. Anschließend wurden Verunreinigungen mit 5 ml Endotoxin Removal Wash durch ein Vakuum beseitigt. Mit 20 ml Column Wash Solution wurden die Salze mittels Vakuum entfernt. Die Membran wurde durch die Vakuumpumpe getrocknet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 400 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

Die Plasmid-Konzentration wurde am Nano Drop 2000 bestimmt.

3.10 Klonierung des 3'UTR der PRKC ϵ

Alle Klonierungsarbeiten wurden in einem dafür vorgesehenen S1-Bereich getätigt. Alle selbst designten Primer wurden von Metabion GmbH, Martinsried bezogen (Primersequenzen siehe Tabelle 6.3). Für die Klonierung des 3'UTRs von PRKC ϵ in den psiCheckTM-2 Vector wurden die Klonierungsprimer Primer FW 3'UTR PRKC ϵ und Primer RV 3'UTR PRKC ϵ mit Schnittstellen für *PmeI* und *XhoI* versehen. Der 3'UTR der PRKC ϵ wurden mit dem StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit gewonnen.

3.10.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des 3'UTR der PRKC ϵ

Durch PCR wurde der 3'UTR der PRKC ϵ aus genomischer DNA amplifiziert.

50 µl Ansatz:

- 100 ng genomische DNA
- 5 µl 10 × PfuUltra II Reaction Buffer
- 25 mM dNTPs
- 1 µl PfuUltra II fusion HS DNA-Polymerase
- 40,5 µl ddH₂O
- 10 µM Primer FW 3'UTR PRKC ϵ
- 10 µM Primer RV 3'UTR PRKC ϵ

PCR-Bedingungen:

- Initial: 95 °C, 2 Minuten
- Amplifikation in 30 Zyklen: 20 Sekunden Denaturieren (95 °C), 20 Sekunden Annealing (62,9 °C) und 30 Sekunden Elongation (72 °C)
- Final: 72 °C, 3 Minuten

Der Erfolg der PCR wurde durch Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel und anschließender Visualisierung unter UV-Licht (E-BOX VX2 Geldokumentationssystem) überprüft, erwartete Amplikon-Länge: 1860 Basenpaare (bp).

3.10.2 Ligation des 3'UTR der PRKC ϵ in Strata Clone Blunt Vector und Transformation in StrataClone SoloPack Competent Cells

Das PCR Produkt (3'UTR von PRKC ϵ) wurde mit dem Strata Clone Blunt Vector (pSCB-ami/kan) ligiert. Die Ligation erfolgte durch die *Topoisomerase*-Aktivität des *Vaccinia Virus* an einem Ende der Vektorarme (3 μ l StrataClone Blunt Cloning Buffer, 2 μ l des PCR-Produkts und 1 μ l StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan) durch fünfzehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Diese linearen DNA-Konstrukte wurden mittels Hitzeschock-Transformation in StrataClone SoloPack Competent Cells transformiert. Hierfür wurden 50 μ l Zellen und der gesamte Ligationsansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C sowie eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde in 250 μ l vorgewärmtem LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf einer LB-Agarplatte (Lysogeny Broth Agar) mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 16 - 20 Stunden in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Vektorarme besitzen am anderen Ende die loxP Region des Bakteriophagen P1. Diese Zellen besitzen die *Cre*-Rekombinase, welche die loxP Seiten erkennt und zu einem zirkulären Konstrukt zusammenfügt, dem pSCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmid. Ein Vektorarm besitzt zusätzlich Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin. Hierdurch konnten nicht transformierte Zellen durch Ampicillin oder Kanamycin eliminiert werden.

3.10.3 Selektion positiver Klone

Von den gewachsenen Klonen wurden einige mittels PCR auf erfolgreiche Ligation überprüft sowie in 3 ml LB-Ampicillin-Medium für eine Miniprep kultiviert (siehe 3.9.1).

Für die PCR wurde je ein Klon in 12 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurde folgender PCR-Mastermix hinzugegeben:

Endvolumen 15 µl:

- 1,5 µl 10 x Taq Puffer
- 5 µM Primer SCB Topovektor FW
- 5 µM Primer SCB Topovektor RW
- 0,3 µl dNTPs
- 1 U Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*: recombinante, thermostabile DNA-Polymerase)

PCR-Bedingungen:

- Initial: 95 °C, 3 Minuten
- Amplifikation in 35 Zyklen: 30 Sekunden Denaturieren (95 °C), 30 Sekunden Annealing (55 °C) und 1 Minute Elongation (72 °C)
- Final: 72 °C für 3 Minuten

Der Erfolg der PCR wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, erwartete Amplikonlänge: 1860 bp.

3.10.4 Gewinnung des SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmids

Das SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmid wurde aus einem positiv selektionierten Klon mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gewonnen (siehe 3.9.1).

3.11 Klonierung des PRKC ϵ -Reporterplasmids psiCheck™-2 Vectors

Das ligierte Plasmid aus psiCheck™-2 Vector und 3'UTR der PRKC ϵ wird im Folgenden als PRKC ϵ -Reporterplasmid bezeichnet.

3.11.1 Restriktionsverdau des SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmids und des psiCheckTM-2 Vectors

Um den 3'UTR der PRKC ϵ aus dem SCB-3'UTR PRKC ϵ Plasmid zu isolieren, wurde dieser mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *PmeI* verdaut. Zudem wurde der psiCheckTM-2 Vector ebenfalls mit denselben Enzymen verdaut. Hierfür wurden je 1 μ g Plasmid-DNA mit 5 μ l New England Puffer 4 (NEBuffer 4), 1 μ g BSA, 1 U *XhoI*, 1 U *PmeI* in einem Endvolumen von 50 μ l für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Der Erfolg des Verdauens wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Erwartete Banden: 4,5 kb StrataClone Ultra Blunt und 1,86 kb 3'UTR PRKC ϵ bzw. 6,253 kb psiCheckTM-2 Vector.

3.11.2 Aufreinigung des 3'UTR der PRKC ϵ und des geschnittenen psiCheckTM-2 Vectors

Der mit *PmeI* und *XhoI* geschnittene 3'UTR der PRKC ϵ und der geschnittene psiCheckTM-2 Vector wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Hierbei wurde pro Milligramm eluiertes Agarosegel-Stück gleiches Volumen an Membrane Binding Solution (Guanidine Isothiocyanat) zugegeben und das Gelstück wurde bei 56 °C geschmolzen. Die Lösung wurde eine Minute auf einem Filter inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm 1 Minute zentrifugiert. In zwei Waschschrritten wurde die DNA von Verunreinigungen befreit. Schließlich wurde die DNA mit 30 μ l Nuklease-freiem Wasser eluiert (1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur, 1 Minute Zentrifugation bei 14.000 rpm) und die jeweilige DNA-Konzentration am Nano Drop 2000 ermittelt.

3.11.3 Ligation des 3'UTR der PRKC ϵ mit dem psiCHECKTM-2 Vector

Der 3'UTR der PRKC ϵ und der psiCheckTM-2 Vector wurden an den Schnittstellen von *XhoI* und *PmeI* ligiert. In einem Endvolumen von 10 μ l wurden 1 μ l T4 Ligase, 1 μ l T4 Ligase Buffer, der psiCheckTM-2 Vector und die 3'UTR der PRKC ϵ in einem Verhältnis von 50 ng zu 150 ng für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Das so gewonnene PRKC ϵ -Reporterplasmid wurde in StrataClone SoloPack Competent Cells transformiert (siehe 3.10.2).

Der psiCheck™-2 Vector besitzt ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Somit konnten Klone ohne erfolgreiche Transformation durch Ampicillin eliminiert werden.

Die Selektion positiver PRKCε-Reporterplasmid-Klone erfolgte analog zu 3.10.3. Bei der PCR wurden die Primer psiCheck FW und psiCheck RW verwendet (siehe Tabelle 6.1).

Der Erfolg der PCR wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Erwartete Banden: PRKCε-Reporterplasmid ca. 2570 bp, leerer psiCheck™-2 Vector ca. 731 bp.

3.11.4 Gewinnung des PRKCε-Reporterplasmids

Die DNA des PRKCε-Reporterplasmids wurde aus einem positiv selektionierten Klon durch das QIAprep Spin Miniprep Kit gewonnen (siehe 3.9.1). Der Erfolg der Klonierung wurde durch erneuten Restriktionsverdau (siehe 3.11.1) und Sequenzierung (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) bestätigt. Plasmid-DNA wurde abschließend mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems gewonnen (siehe 3.9.2).

3.12 Mutagenese des PRKCε-Reporterplasmids

Die Bindestellen für die miRNA-146a im 3'UTR der PRKCε wurden mit Hilfe des QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit mutiert. Für jede Bindestelle wurden zwei Basen in der Seed-Sequenz der miRNA-146a mittels PCR mutiert. Nur die vier Bindestellen mit der höchsten Bindewahrscheinlichkeit wurden jeweils separat mutiert.

PCR Endvolumen 50 µl:

- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 1 µl PRKCε-Reporterplasmid (100 ng)
- 1,25 µl Mutationsprimer PRKCε (1,2 oder3) FW (125 ng)
- 1,25 µl Mutationsprimer PRKCε (1,2 oder3) RV (125 ng)
- 1 µl dNTP Mix
- 1,5 µl QuikSolution Reagent
- 38 µl Nuklease-freies Wasser
- 1 µl QuikChange Lightning Enzym

PCR-Bedingungen:

- Initial: 95 °C, 2 Minuten
- Amplifikation in 18 Zyklen: 20 Sekunden Denaturieren (95 °C), 10 Sekunden Annealing (60 °C) und 4 Minuten (entspricht 30 Sekunden pro kb des Plasmids) DNA-Synthese (68 °C)
- Final: 68 °C für 5 Minuten

3.12.1 Verdau der parentalen DNA

Die parentale DNA des PCR Produkts wurde mit dem *Dpn I* Restriktionsenzym (2 µl, 15 Minuten 37 °C Inkubation) verdaut. Da das PRKCε-Reporterplasmid aus dam+ (DNA-Adenine Methyltransferase positive) *E.coli* Bakterien stammte (siehe 3.10.2), war es am Adenin methyliert. Das Restriktionsenzym *Dpn I* erkennt und verdaut nur methylierte parentale DNA und kann in der PCR amplifizierte, nicht methylierte DNA nicht erkennen.

3.12.2 Transformation der mutierten PRKCε-Reporterplasmide

Die mutierten PRKCε-Reporterplasmide (PRKCε-Reporterplasmid Mut1, Mut2, Mut3 und Mut4) wurden mittels Hitzeschock-Transformation jeweils in XL10-Gold Ultracompetent Cells transformiert.

Hierfür wurden 45 µl XL10-Gold Ultracompetent Cells und 2 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol vermischt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Je 2 µl mutiertes PRKCε-Reporterplasmid Mut1, Mut2, Mut3 oder Mut4 wurden zugegeben und erst 30 Minuten auf Eis, dann 30 Sekunden bei 42 °C und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in 500 µl vorgewärmtem LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm in einem Kompaktthermoschüttler geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Zellen vermehrten sich für 16 - 20 Stunden in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und 5% CO₂. Der psiCheck™-2 Vector besitzt ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Somit konnten Klone ohne erfolgreiche Transformation durch Ampicillin eliminiert werden.

3.12.3 Gewinnung des PRKCε-Reporterplasmids

Analog 3.11.4 ohne Restriktionsverdau.

3.13 Luciferasemessung von transfizierten HEK-Zellen

Die unter 3.12 gewonnenen Plasmide (PRKC ϵ -Reporterplasmid und die mutierten PRKC ϵ -Reporterplasmide (Mut1, Mut2, Mut3 und Mut4)) wurden mit miR-146a bzw. miR-NC durch Elektroporation in HEK-Zellen kotransfiziert.

Der psiCheck™-2 Vector besitzt zwei Luciferasen, die Renilla und die Firefly Luciferase.

Der 3'UTR wurde so in die MCS (Multiple Cloning Site) des psiCheck™-2 Vectors inkloniert, dass er 3', also hinter dem *Renilla-Luciferase*-Gen zu liegen kam. Somit wurden beide Gene gemeinsam transkribiert und die Renilla Luciferase wurde als Reporter für die PRKC ϵ mRNA verwendet. Die Firefly Luciferase wurde als Kontrollreporter mit kontinuierlicher, unabhängiger Transkription verwendet. Kotransfektion der miR-146a bewirkt Abbau der PRKC ϵ mRNA und damit auch der Renilla mRNA. Daraus folgte eine geringere Renilla-Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Proben mit kotransfizierter miR-NC.

Die Aktivitäten des Kontrollreporters Firefly Luciferase und des Reporters Renilla Luciferase wurden mit dem Dual-Glo™ Luciferase Assay System gemessen.

Durch Luciferasemessung wurde auch die Regulierung der STAT4-Aktivität durch die PRKC ϵ bestimmt. In HEK-Zellen wurde durch Elektroporation ein STAT4-Luciferase-Reporter (Firefly) und ein unabhängiger Kontrollreporter (Renilla) zusammen mit der siRNA gegen PRKC ϵ oder einer „Non-Targeting siRNA“ als Kontrolle kotransfiziert. Der Firefly STAT4-Luciferase-Reporter enthält ein DNA bindendes cis-Element, an das der aktive Transkriptionsfaktor STAT4 binden kann und wodurch über einen Promoter die Expression des *Firefly-Luciferase*-Gens induziert wird. Kotransfektion der siRNA gegen PRKC ϵ bewirkt eine verminderte PRKC ϵ Expression und damit eine verminderte PRKC ϵ -Aktivität. Dies führt zu einer reduzierten STAT4-Aktivität, was durch eine geringere Firefly-Luciferase-Aktivität, im Vergleich zu Proben mit kotransfizierter „Non-Targeting“ siRNA führt.

Die Aktivitäten des Kontrollreporters Renilla Luciferase und des STAT4-Luciferase-Reporters Firefly Luciferase wurden mit dem Dual-Glo™ Luciferase Assay System gemessen.

Methoden

Alle Luciferasemessungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen mit dem Dual-Glo™ Luciferase Reagent lysiert und die Firefly Luciferase aktiviert (1:1 Dual-Glo™ Luciferase Buffer: Dual-Glo™ Luciferase Substrat), (1:1 Zellsuspension: Reagent, Inkubation 10 Minuten). Die Aktivität der Firefly Luciferase wurde durch ein Luminometer, den Lumat LB 9507, gemessen.

Anschließend wurde gleiche Menge an Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagent (1:100 Dual-Glo™ Stop & Glo® Substrat: Dual-Glo™ Stop & Glo® Buffer) zu der Zellsuspension gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die daraus resultierende Aktivität der Renilla Luciferase durch den Lumat LB 9507 gemessen.

Um die spezifische zelluläre Antwort zu berechnen, die den Zelltod als Ursache ausschließt, wurde die Aktivität der Renilla Luciferase auf die Aktivität der Firefly Luciferase normiert.

4 Resultate

4.1 Die Expression von miRNA-146a wird in humanen T-Zellen durch Aktivierung verstärkt, ist jedoch bei septischen Patienten vermindert

Um einen ersten Einblick in die Funktion der miRNA-146a in der adaptiven Immunantwort zu erlangen, wurde die miRNA-146a Expression mittels qRT-PCR in unbehandelten und in mit CD3/CD28 Antikörpern stimulierten Pan T-Zellen (CD8+ und CD4+) von gesunden Probanden untersucht. Wie Abbildung 1A zeigt, konnte nach T-Zell-Rezeptor-spezifischer Aktivierung der T-Zellen ein signifikanter Anstieg des miRNA-146a Spiegels beobachtet werden (unstimuliert: $0,14 \pm 0,02$; stimuliert: $0,20 \pm 0,02$; * $p < 0,006$; $n=6$).

Bei T-Zellen von Sepsispatienten, die 48 Stunden nach klinischer Diagnosestellung entnommen worden waren, konnte hingegen eine signifikante Expressionsverminderung um 43,8% der miRNA-146a festgestellt werden (siehe Abbildung 1B; * $p < 0,005$; $n=16$).

Diese starke Veränderung der miRNA-146a Expression im Krankheitsbild der Sepsis lässt einen möglichen Einfluss der miRNA-146a auf die adaptiven Immunantwort vermuten. Dies sollte im Weiteren untersucht werden.

Resultate

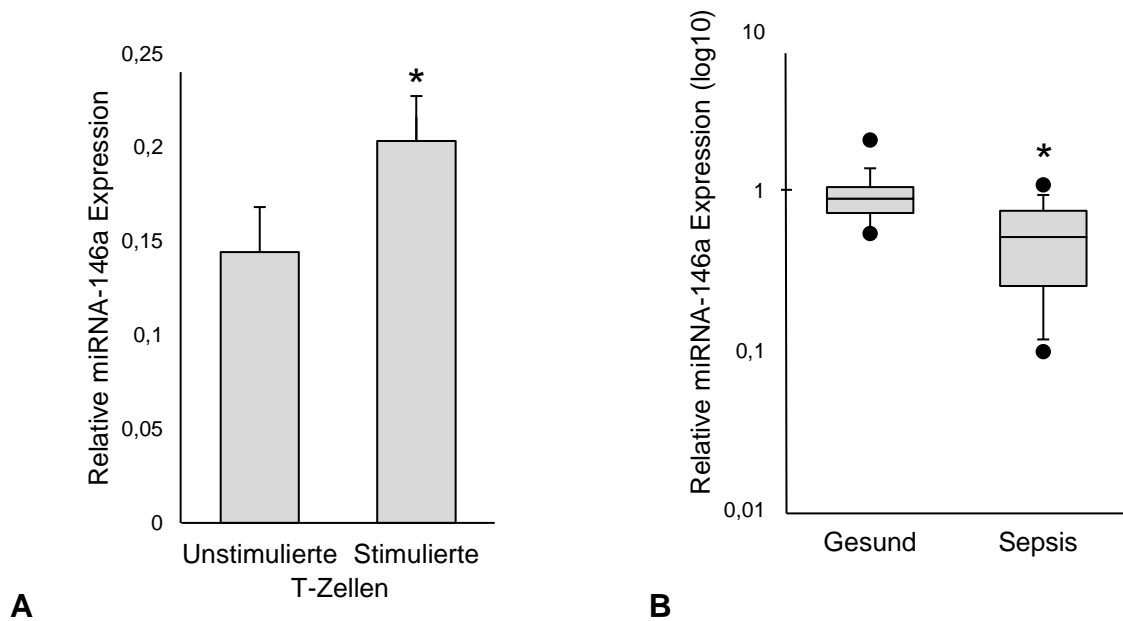


Abbildung 1: (A) T-Zellen wurden aus dem Blut freiwilliger Probanden isoliert. Die miRNA-146a Expression wurde vor und nach 24 stündiger Stimulation mit CD3/CD28 Antikörpern bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt und repräsentieren sechs unabhängige Experimente, jeweils als Duplikat durchgeführt. * $p < 0,006$; $n=6$. (B) Die miRNA-146a Expression wurde in T-Zellen von freiwilligen, gesunden Probanden und von Sepsispatienten mittels qRT-PCR bestimmt. Die Werte sind als Median, 25te, 75te Perzentile und outlier dargestellt. Sie repräsentieren sechzehn unabhängige Experimente je Gruppe, jeweils als Duplikat durchgeführt. * $p < 0,005$; $n=16$.

4.2 Die miRNA-146a übt einen hemmenden Einfluss auf die Th1-Zelldifferenzierung aus

Um die Funktion der miRNA-146a in T-Zellen zu überprüfen, wurden die mRNA Level der Effektorzytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 und IL-10 mittels qRT-PCR in T-Zellen von gesunden Probanden untersucht, nach Stimulation mit CD3/CD28 Antikörpern und Transfektion mit einem synthetischen Präkursor von miRNA-146a (miR-146a) oder als Kontrolle mit der miR-NC. Wie man Abbildung 2 entnehmen kann, war die Expression der mRNA der Th1-Zell spezifischen Zytokine IFN- γ ($56,9\% \pm 9,1$), TNF- α ($70,4\% \pm 14,6$) und IL-2 ($83,0\% \pm 7,5$) signifikant vermindert (* $p < 0,05$; $n=6$). Dagegen nicht beeinflusst wurde die Expression der Th2-Zell typischen Zytokine, IL-4 ($106,0\%$) und IL-10 ($99,9\%$).

Resultate

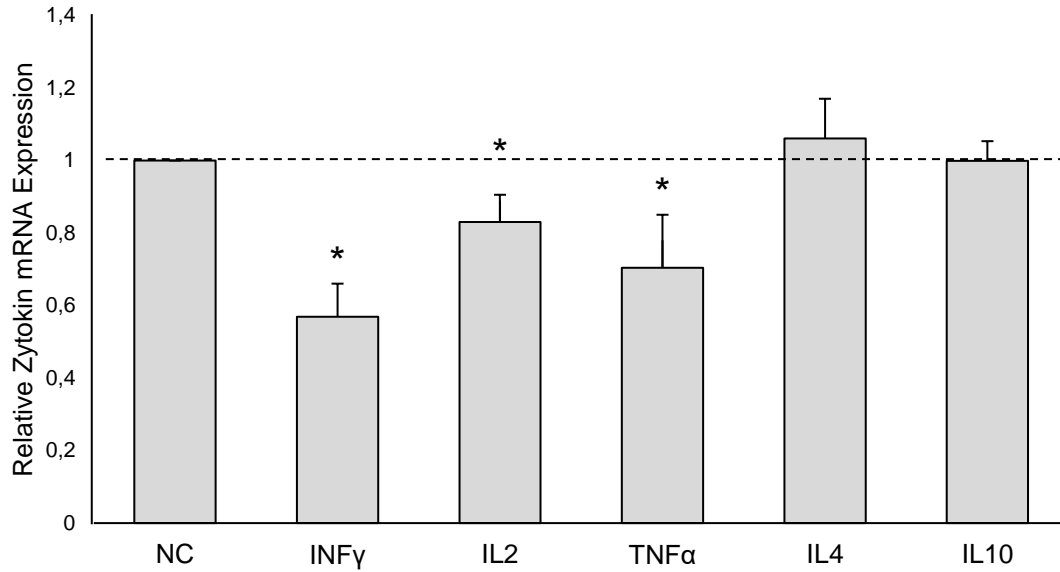


Abbildung 2: Pan T-Zellen von sechs gesunden Freiwilligen wurden mit einem synthetischen Präkursor von miRNA-146a (miR-146a) oder mit einer nicht kodierenden miR-Kontrolle (NC) transfiziert. Nach CD3/CD28 Stimulation über 24 Stunden wurde die mRNA Expression der jeweiligen Zielgene mittels qRT-PCR gemessen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung relativ zur NC dargestellt und repräsentieren sechs unabhängige Experimente je Gruppe, jeweils als Duplikat durchgeführt. * $p < 0,05$; $n=6$.

Da die miRNA-146a die Zytokinproduktion primärer T-Zellen in Richtung einer Th1-Zelldifferenzierung beeinflusst, wurden CD4⁺T-Zellen von gesunden Probanden vor und nach Kultivierung für fünf Tage unter Th1-differenzierenden Bedingungen mit miR-146a bzw. miR-NC transfiziert und erneut mittels qRT-PCR die mRNA Spiegel der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α bestimmt. Bei den Th1 typischen Zytokinen IFN- γ (94,7% \pm 10,8), IL-2 (105,0% \pm 7,4) und TNF- α (100,3% \pm 6,3), konnte in ausdifferenzierten Th1-Zellen nach miRNA-146a Überexpression überraschenderweise keine signifikante Veränderung gefunden werden. In den CD4⁺T-Zellen konnte erneut eine signifikante Reduktion der für die Th1-Zelldifferenzierung wichtigen Zytokine beobachtet werden (siehe Abbildung 3; * $p < 0,05$; $n=6$).

Resultate

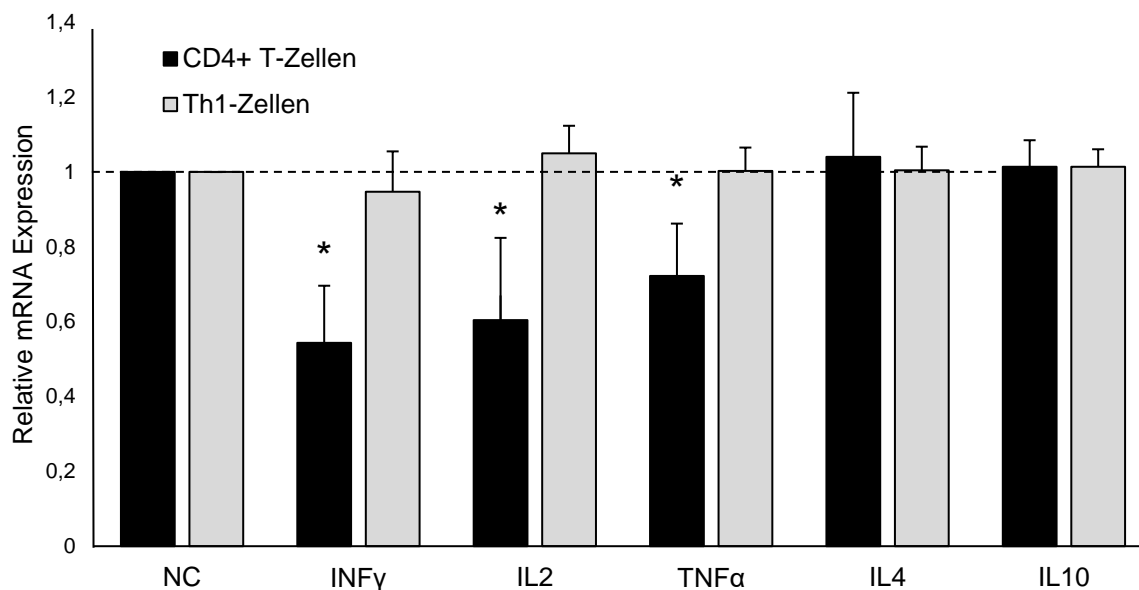


Abbildung 3: Unbehandelte CD4+T-Zellen (schwarz) oder CD4+T-Zellen, die zuvor für 120 Stunden unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert worden waren (grau), wurden mit miR-146a oder einer Kontrolle transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mittels CD3/CD28 Antikörpern über 24 Stunden stimuliert. Über qRT-PCR wurden die mRNA Spiegel der angegebenen Zytokine bestimmt. *p < 0,05; n=6.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die miRNA-146a bei bereits ausdifferenzierten Th1-Zellen nicht in die Regulation der Zytokinexpression eingreift, jedoch in primären T-Zellen hemmend auf die Zytokinproduktion der Th1-Zell typischen Zytokine wirkt. Aus diesen Beobachtungen heraus stellen wir unsere Hypothese auf, dass die miRNA-146a einen Faktor als Ziel haben könnte, der Einfluss auf die Th1-Zelldifferenzierung nimmt und der nach erfolgter Differenzierung an Einfluss verliert.

4.3 STAT4 fördert die Th1-Zelldifferenzierung und wird über die miRNA-146a indirekt beeinflusst

Für die Th1-Zelldifferenzierung im Mausmodell ist bekannt, dass sie durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“), T-bet (ein T-box Transkriptionsfaktor), STAT1 und STAT4 (Signal transducer and activator of transcription) angetrieben wird [22], [23], [24]. Um zu bestimmen, ob einer dieser Transkriptionsfaktoren miRNA-146a abhängig die Th1-Zelldifferenzierung beeinflusst, wurde deren Expression in unbehandelten CD4⁺T-Zellen als auch während des Th1-Differenzierungsprozesses gemessen. Abbildungen 4A und 4B verdeutlichen eine gleichmäßige Zunahme der STAT1 und T-bet Expression während der Th1-Differenzierung mit gleichmäßig hohen Spiegeln nach 5 Tagen. STAT4 zeigte dagegen eine sehr hohe Expression zu Beginn der Th1-Differenzierung mit nachfolgendem Abfall (siehe Abbildung 4C). Um diese Beobachtung weiter zu verifizieren, wurde die Expression von Interleukin 12 receptor subunit beta 2 (IL12Rb2) bestimmt. IL12Rb2 ist eine Untereinheit des Interleukin 12 Rezeptorkomplex und führt zur Formation von IL12 Bindestellen und damit zur Aktivierung des IL12-Signalwegs. Die Expression von IL12Rb2 wird durch IFN- γ hochreguliert. In Th1-Zellen führt der IL12-Signalweg zur Phosphorylierung von STAT4 und führt damit zur Th1 Differenzierung [25]. Es zeigte sich ein übereinstimmender Verlauf zu STAT4 (siehe Abbildung 4D) [26].

Resultate

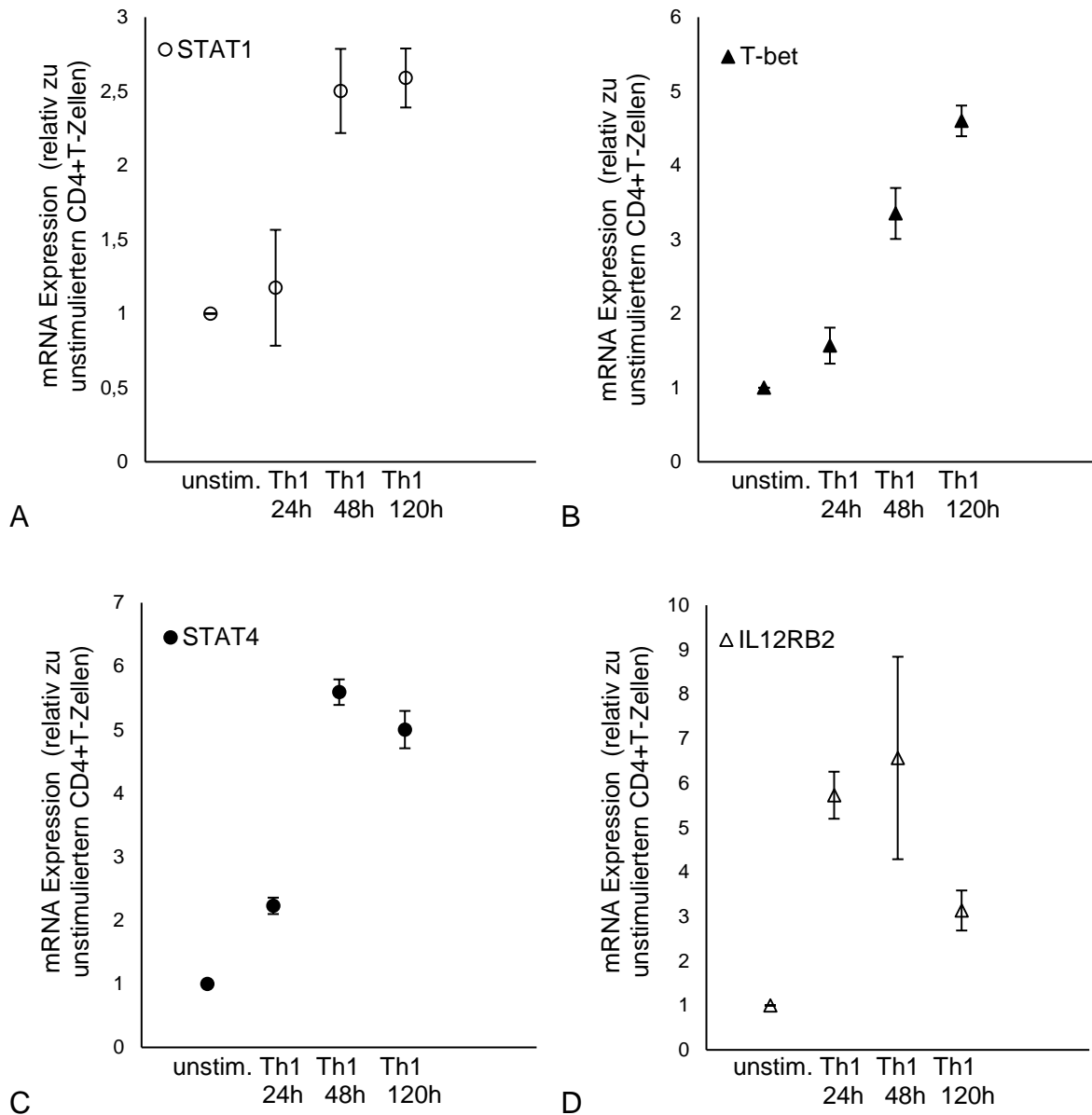


Abbildung 4 A-D: CD4+T-Zellen wurden unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert und die mRNA Spiegel durch qRT-PCR von STAT1, STAT4, T-bet und IL12RB2 vor (unbehandelte CD4+T-Zellen) und während der Th1-Zelldifferenzierung bestimmt (Inkubationszeiten wie angegeben). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung gezeigt und repräsentieren vier unabhängige Experimente, jedes als Duplikat durchgeführt. * $p < 0,05$; $n=4$.

Resultate

Da die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine von ihrem Phosphorylierungszustand abhängt, wurde dieser durch Westernblot für Phospho-STAT1 (pSTAT1) und pSTAT4 überprüft. In unbehandelten CD4+T-Zellen war ein phosphorylierter Zustand nur mäßig nachweisbar, wohingegen während der Th1-Differenzierung ein starker Anstieg beobachtet werden konnte. Auch hier konnte erneut ein Anstieg von pSTAT1 mit maximalem Nachweis nach fünf Tagen gesehen werden, während pSTAT4 nach einem ersten Anstieg wieder rasch abfiel (siehe Abbildung 5).

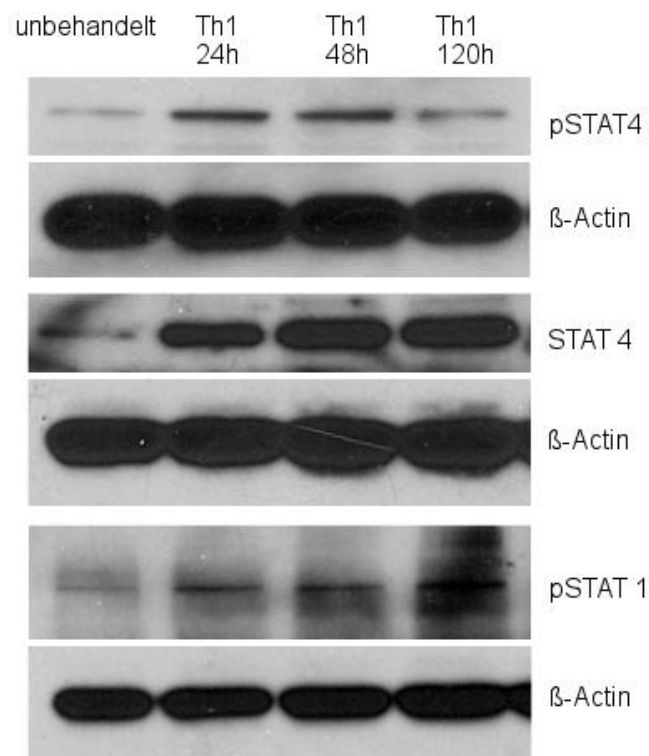


Abbildung 5: Die Proteinexpression von STAT4, pSTAT4 (Y693) und pSTAT1 (Y201) wurde in den gleichen Proben der Experimente aus Abbildung 4 durch Westernblot Analyse bestimmt. Je ein Experiment von n=3 ist dargestellt.

Diese Messungen ließen vermuten, dass STAT4 der bisher unbekannte Transkriptionsfaktor ist, über den die miRNA-146a Einfluss auf die Th1-Differenzierung nimmt.

Die Zytokinproduktion wurde daher in CD4+T-Zellen mit STAT4 Knock-Down durch Transfektion einer siRNA gegen STAT4 bestimmt. Zudem wurde die Zytokinexpression nach Stimulation über CD3/CD28 Antikörper ermittelt. Wie

Resultate

Abbildung 6 zu entnehmen ist, wurden durch siRNA die Expressionsspiegel der Th1-Zell spezifischen Zytokine signifikant reduziert (IFN- γ 50,7% \pm 8,5; IL-2 62,3% \pm 9,1 und TNF- α 82,5% \pm 4,5; * p < 0,05; n=4). In einem gleichen Experiment mit T-Zellen, die 5 Tage unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert worden waren, blieb eine signifikante Veränderung der Zytokinexpression jedoch aus (IFN- γ 105,8% \pm 11,0; IL-2 97,8% \pm 3,6 und TNF- α 82,5% \pm 3,5; * p < 0,05; n=4).

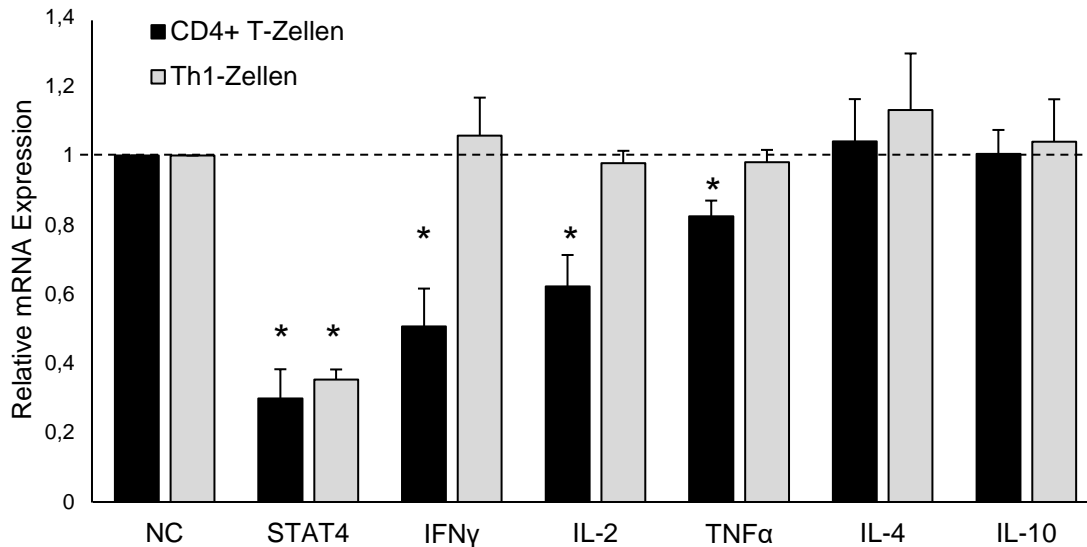


Abbildung 6: Unbehandelte CD4+T-Zellen (schwarz) oder CD4+T-Zellen, die zuvor für 120 h unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert worden waren (grau), wurden mit siSTAT4 oder einer nicht bindenden Kontrolle transfiziert und die mRNA Spiegel von Zytokinen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung gezeigt und repräsentieren vier unabhängige Experimente, jedes als Duplikat durchgeführt. * p < 0,05; n=4.

Um den molekularen Mechanismus zu bestimmen, mit dem die miRNA-146a den vermuteten Einfluss auf die STAT4 Aktivität nimmt, wurde zunächst die STAT4 Expression nach Transfektion mit miR-146a und Stimulation mit CD3/CD28 Antikörpern in CD4+T-Zellen bestimmt. Tatsächlich wurde die Expression von STAT4 nicht durch die miRNA-146a beeinflusst (siehe Abbildung 7A). Über Westernblotanalyse konnte jedoch nach gleicher Vorbehandlung in CD4+T-Zellen eine stark verminderte STAT4 Phosphorylierung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7B). Aus diesen Ergebnissen vermuteten wir eine indirekte Wirkung der miRNA-146a auf die STAT4 Phosphorylierung.

Resultate

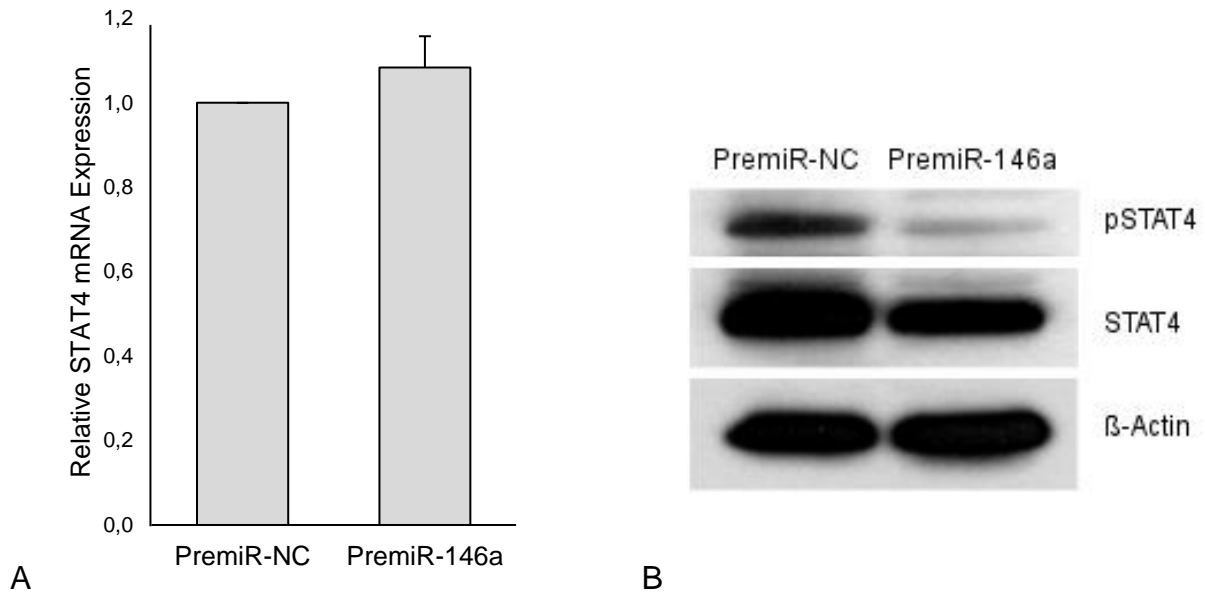
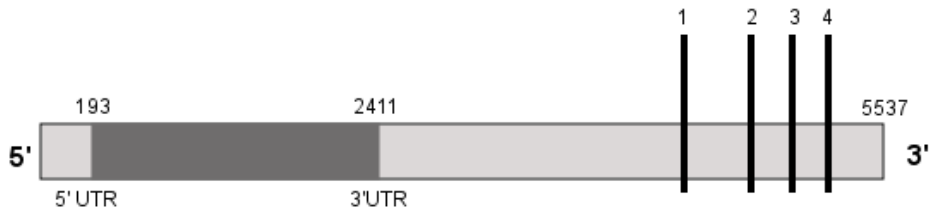


Abbildung 7: Unbehandelte CD4+T-Zellen wurden mit miR-146a oder einer nicht kodierenden Kontrolle transfiziert. Nach CD3/CD28 Stimulation wurde die STAT4 mRNA Expression mittels **(A)** qRT-PCR ermittelt. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung gezeigt und repräsentieren drei unabhängige Experimente, jedes als Duplikat durchgeführt. **(B)** Die STAT4 und pSTAT4 Proteinexpression wurde durch Westernblotanalyse mit spezifischen Antikörpern bestimmt. Ein Experiment von n=3 ist dargestellt.

4.4 Die miRNA-146a bindet direkt an PRKC ϵ und vermindert darüber die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT4

Durch bioinformatische Analysen [27] wurde als mögliches durch die miRNA-146a reguliertes Zielgen die PRKC ϵ bestimmt. Diese Regulation könnte für die veränderte Zytokinexpression verantwortlich sein, denn es handelt sich um: 1. Eine Kinase die für den Einfluss der miRNA-146a auf die Phosphorylierung von STAT4 und damit für die veränderte Zytokinexpression verantwortlich sein könnte. 2. Der 3' UTR enthält vier spezifische Zielsequenzen mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit, die durch Computersimulation ermittelt werden konnten (siehe Abbildung 8).

Humane Proteinkinase C epsilon



	hsa-mir-146a	3' UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU
1	PRKCε 3'UTR 1312-1317	5' ...UCUUUCAUUUCCAAGGGUUCUCU...
2	PRKCε 3'UTR 1955-1961	5' ...CUAUGAUGACAUUCAGUUCUCU...
3	PRKCε 3'UTR 2237-2243	5' ...UUCAUGTGTAACUACUGUUCUUUC...
4	PRKCε 3'UTR 2501-2508	5' ...GCCUCUGGCUGGUGAAGUUCUCA...

Abbildung 8: PRKCε ist ein Zielgen der miRNA-146a. Dargestellt ist die Sequenz und Lokalisation der miRNA-146a Bindestellen mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit (hervorgehoben) in der 3' UTR von PRKCε.

Um diese wahrscheinliche, direkte Interaktion der miRNA-146a und der PRKCε zu beweisen, wurden primäre humane T-Zellen mit miR-146a, antimiR-146a oder zur Kontrolle mit der miR-NC transfiziert und anschließend mit CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Durch qRT-PCR wurden die PRKCε mRNA Expression bestimmt. Diese wurde durch die miR-146a im Vergleich zur Kontrolle miR-NC signifikant auf 67,0% ± 15,3 vermindert. Durch Transfektion mit antimiR-146a konnte dagegen eine verstärkte PRKCε Expression gemessen werden (siehe Abbildung 9A; 121,3% ± 4,7; *p < 0,05; n=6). Zudem konnte ebenfalls eine verminderte Protein Expression nach Transfektion mit miR-146a via Westernblot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9B).

Resultate

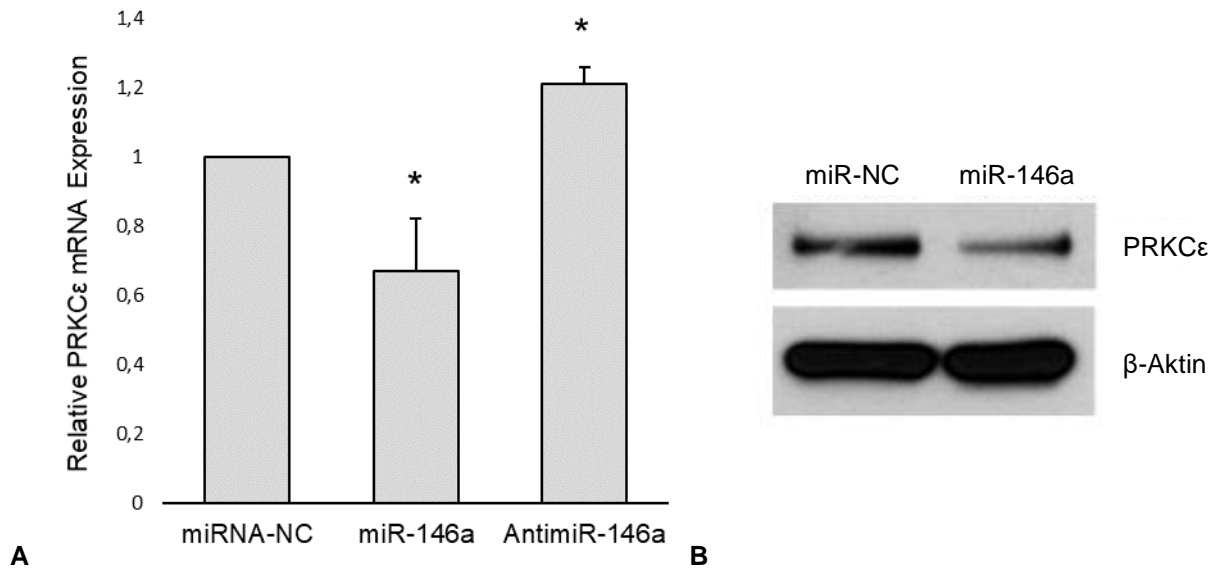


Abbildung 9: CD4+T-Zellen von gesunden Freiwilligen wurden entweder mit miR-146a, anti-miR-146a oder mit einer nicht kodierenden Kontrolle (miRNA-NC) transfiziert **(A)**. Die relative mRNA Expression von PRKCε wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und repräsentieren sechs unabhängige Experimente, die jeweils als Duplikat durchgeführt worden sind. * $p < 0,05$; $n=6$. **(B)** Zusätzlich wurde die PRKCε Proteinexpression in mit miR-146a oder nicht kodierender Kontrolle (miR-NC) transfizierten Zellen mittels spezieller Antikörper durch Westernblotanalyse nachgewiesen. Ein Experiment von $n=4$ ist dargestellt.

Die vermutlich direkte Bindung und Interaktion der miRNA-146a an die PRKCε wurde über Luciferasereporter Versuche untersucht. Der 3'UTR der PRKCε wurde hierfür in die Multiple Cloning Site (MCS) eines Luciferasevektors kloniert und dieser zusammen mit miR-146a bzw. miR-NC in HEK-Zellen kotransfiziert. Die direkte Bindung der miRNA-146a an den 3'UTR der PRKCε wurde durch Messung der Luciferase-Aktivität der Reporter bestimmt. Es zeigte sich, dass die Luciferase-Aktivität durch die miRNA-146a im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf $49,2\% \pm 6,7$ reduziert wurde (siehe PRKCε WT, Abbildung 10; * $p < 0,05$; $n=8$).

Um den Einfluss jeder einzelnen der vier vermuteten miRNA-146a-Bindestellen im 3'UTR der PRKCε zu untersuchen, wurde die jeweilige Bindestelle durch Punktmutation eliminiert. Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, wurde die Luciferase-Aktivität jedes mutierten Reporters durch miR-146a im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Mut1: $70,3\% \pm 13,6$; Mut2: $75,1\% \pm 13,6$; Mut3: $56,3\% \pm 1,7$; Mut4: $76,5\% \pm 11,5$). Allerdings fiel diese Verminderung der Luciferase-Aktivität deutlich geringer

Resultate

aus, als beim ursprünglich unmutierten PRKC ϵ -Reporter (49,2%). Bei Eliminierung aller 4 Bindestellen durch Punktmutation konnte keine signifikante Änderung der Luciferase-Aktivität durch miR-146a im Vergleich zur Kontrolle mehr gefunden werden (siehe Abbildung 10; Mut 1-4: 89,5% \pm 15,9; *p < 0,05; n=8).

Dies lässt darauf schließen, dass alle vier Bindestellen für die miRNA-146a im 3'UTR der PRKC ϵ an der Inhibition der Transkription der PRKC ϵ beteiligt sind. Für die gesamte inhibitorische Wirkung der miRNA-146a ist wahrscheinlich ein Zusammenspiel der vier untersuchten Bindestellen verantwortlich.

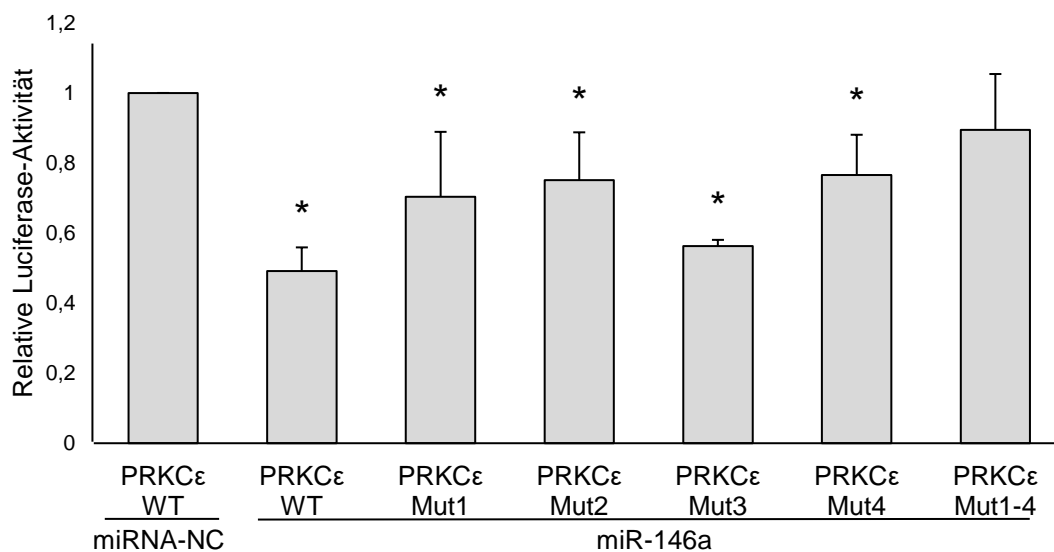


Abbildung 10: Dargestellt ist ein Luciferase Assay, der die Aktivität des Wildtyp PRKC ϵ 3'UTR (PRKC ϵ WT) und von mutierten Vektoren zeigt (PRKC ϵ Mut 1, PRKC ϵ Mut2, PRKC ϵ Mut3, PRKC ϵ Mut4, mit je einer mutierten Bindestelle für miRNA-146a 1, 2, 3 oder 4, PRKC ϵ Mut1-4 mit Mutation aller vier Bindestellen), die mit miR-NC oder mit miR-146a kotransfiziert wurden. Die Werte sind als hRluc-Aktivität gezeigt in Relation zu Wildtyp PRKC ϵ 3'UTR. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und repräsentieren acht unabhängige Experimente, die jeweils als Triplikat durchgeführt worden sind. *p < 0,05; n=8.

Um die funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Expression der miRNA-146a und der PRKC ϵ in CD4 $^+$ T-Zellen und während der Th1-Differenzierung gemessen. Abbildung 11 zeigt, dass während der Th1-Differenzierung die miRNA-146a Expression deutlich zunimmt, wohingegen die Expression der PRKC ϵ mRNA abnimmt.

Resultate

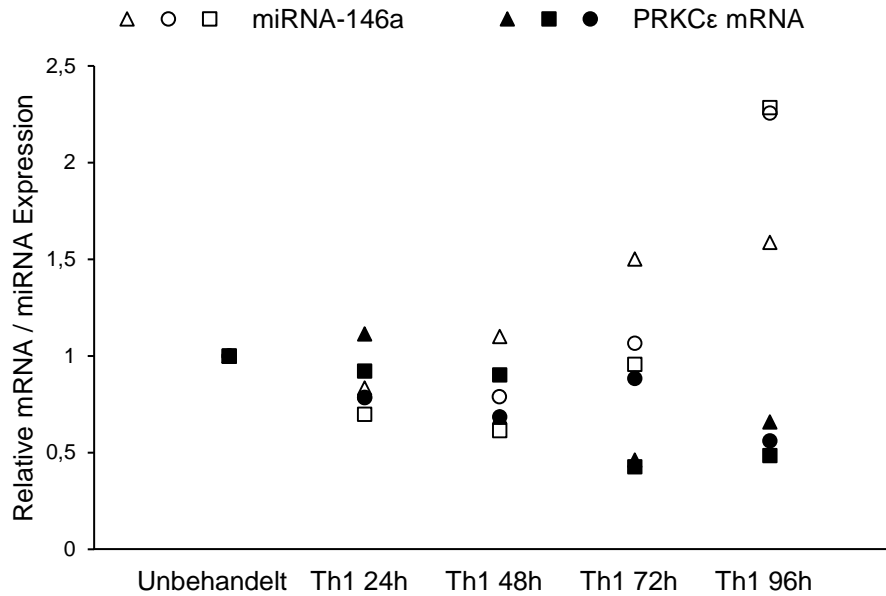


Abbildung 11: CD4+T-Zellen wurden unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert. Die Expression von PRKC ϵ mRNA und miRNA-146a wurde vor Kultivierung, also unbehandelt, und während der Th1-Zelldifferenzierung mittels qRT-PCR ermittelt (n=3, in Duplikaten), Inkubationszeit, wie angegeben. Die einzelnen Symbole stellen jeweils unterschiedliche Probanden dar.

Nach dem Nachweis der direkten Hemmung der PRKC ϵ durch Bindung der miRNA-146a über vier Bindungsstellen am PRKC ϵ 3'UTR sollte nun die tatsächliche Phosphorylierung und Aktivierung der STAT4 durch die PRKC ϵ und dem damit verbundenen Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung zu Th1-Zellen bewiesen werden. Hierfür wurde erneut ein Luciferase-Versuch durchgeführt. Ein STAT4-Luciferase-Reporter (Firefly) und ein unabhängiger Kontrollreporter (Renilla) wurden zusammen mit der siRNA gegen PRKC ϵ oder einer „Non-Targeting“ siRNA als Kontrolle in HEK-Zellen kotransfiziert. Durch Messung der Luciferase-Aktivität der Reporter wurde die Aktivität der STAT4 bestimmt. Diese wurde durch den PRKC ϵ Knock-Down im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf $60,1\% \pm 5,7$ reduziert (siehe Abbildung 12; *p < 0,05; n=3). Damit ist erwiesen, dass PRKC ϵ die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT4 auf Proteinebene beeinflusst.

Resultate

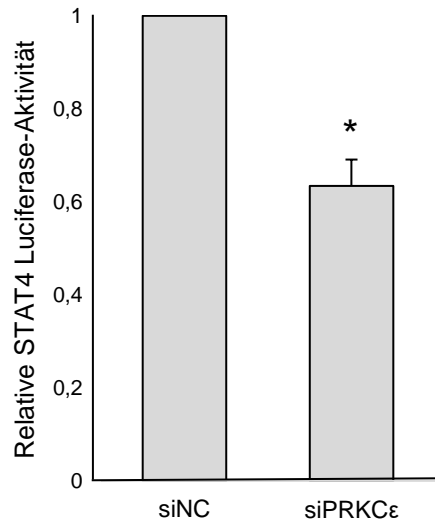


Abbildung 12: CD4+T-Zellen, die zuvor für 72 Stunden unter Th1-differenzierenden Bedingungen kultiviert worden waren, wurden mit einem STAT4 Luciferase Reportervektor sowie zur Kontrolle mit einem Renilla Luciferase-Vektor und jeweils mit siPRKCE oder siNC kotransfiziert. Dargestellt ist die relative Luciferase-Aktivität. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und repräsentieren drei unabhängige Experimente, die jeweils als Triplikat durchgeführt worden sind. * $p < 0,05$; $n=3$.

In Zusammenschau aller bisher durchgeführten Experimente zeigt sich, dass die miRNA-146a die PRKCE durch direkte Bindung an die 3'UTR inhibiert und darüber durch verminderte Phosphorylierung als Inhibitor des Transkriptionsfaktors STAT4 wirkt. Über diesen Mechanismus hat die miRNA-146a einen hemmenden Einfluss auf die Th1-Zelldifferenzierung in primären CD4+T-Zellen.

4.5 Der Einfluss der miRNA-146a auf die Aktivierung von STAT 4 über die direkte Hemmung der PRKC ϵ spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis

Schließlich wurden T-Zellen von Sepsispatienten untersucht. Hier konnte in Übereinstimmung mit der schon bekannt verminderten miRNA-146a Expression (siehe Abbildung 1B) eine im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte Expression der PRKC ϵ mRNA gemessen werden (162,6%; siehe Abbildung 13; *p < 0,05; n=3).

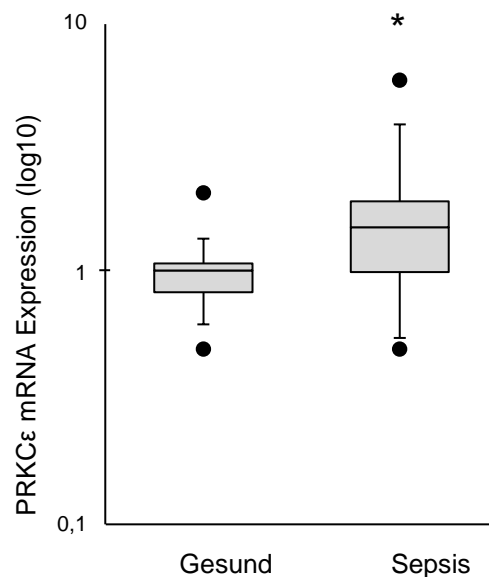


Abbildung 13: In T-Zellen von Sepsispatienten und gesunden Probanden wurde die PRKC ϵ mRNA Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Die Werte sind als Median, 25te, 75te Perzentile und Ausreißer dargestellt. Sie repräsentieren sechzehn unabhängige Messungen je Gruppe, jeweils als Duplikat durchgeführt. *p < 0,05; n=16.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die direkte Regulation der PRKC ϵ durch die miRNA-146a und die darauffolgende Hemmung der STAT4 Aktivierung via Phosphorylierung in der Pathogenese der Sepsis eine wichtige Rolle spielen könnte. Die beobachtete verminderte miRNA-146a Expression könnte eine Enthemmung der Th1-Immunantwort begünstigen, die in der ersten Phase der Sepsis beobachtet werden kann.

5 Diskussion

Die T-Zellen des erworbenen Immunsystems sind ein wichtiger Schutz gegen die Invasion von Keimen [28]. Eine überschießende Immunantwort führt jedoch zu entzündungsbedingten Erkrankungen, wie autoimmunen Erkrankungen, allergischen Reaktionen, Tumorentstehung und Sepsis [6, 11]. Um eine „fehlgerichtete“ Aktivierung des Immunsystems und die darauffolgende Schädigung des Organismus zu verhindern, gibt es vielschichtige Mechanismen, die die Immunantwort regulieren. Zahlreiche Studien beschreiben die Rolle von miRNAs als essentielle Regulatoren der T-Zellantwort [29, 30].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle der miRNA-146a in der Regulation der T-Zellantwort im Krankheitsbild der Sepsis. In Mausexperimenten wurde bereits gezeigt, dass die miRNA-146a die Immunantwort v.a. über Beeinflussung der T-Zellaktivität dämpft [22, 28]. Zudem konnten im Mausmodell bereits in verschiedenen Signalwegen der T-Zellen Angriffspunkte für die miRNA-146a gefunden werden.

Die miRNA-146a hemmt die Proteine IRAK1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1) und TRAF6 (TNF receptor associated factor). Diese Proteine führen über die Aktivierung des mitogen-activated protein (MAP)-Kinase-Wegs und des NF- κ B-Signalwegs zur erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (wie z.B. TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10). Die miRNA-146a hemmt damit über TRAF6 und IRAK1 die MAPK- und NF- κ B-vermittelte Immunantwort sowie über eine negative Feedbackschleife ihre eigene Expression. In Leukozyten von Knock-Down-Mäusen [22, 28, 31, 32] und für menschliche Monozyten [33-38] konnte dieser Zusammenhang gezeigt werden.

Zudem konnte in Knock-Down-Mäusen gezeigt werden, dass miRNA-146a die Suppression der Th1-Zelldifferenzierung über die Hemmung von STAT1 vermittelt und damit eine Dämpfung der Th1-Zell Immunantwort bewirkt [23, 28].

Die Balance zwischen Th1- und Th2-Antwort von T-Helfer Zellen ist essentiell wichtig, um eine pathologische Immunantwort zu vermeiden [35]. Obwohl anhand von Mausexperimenten die wichtige Rolle und Vernetzung der miRNA-146a in der Regulation des adaptiven Immunsystems gezeigt wurde, bleibt der größte Anteil ihrer Regulationsmechanismen, besonders in humanen Immunzellen, noch unbekannt [28].

Diskussion

Das Immunsystem von Mensch und Maus ist nicht identisch, so dass man die am Mausmodell gefundenen Regulationsmechanismen nicht direkt auf den Mensch übertragen kann [39].

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die miRNA-146a die humane T-Zellantwort im Krankheitsgeschehen der Sepsis beeinflusst. Im Vergleich zu gesunden Probanden wurde mittels qRT-PCR eine signifikant verminderte Expression der miRNA-146a in den T-Zellen von septischen Patienten festgestellt. Durch Überexpression von miRNA-146a in primären T-Zellen gesunder Probanden konnte zudem eine signifikante Reduzierung der mRNA Spiegel von Th1-Zell spezifischen Zytokinen, IFN- γ , IL-2 und TNF- α festgestellt werden. Die mRNA von Th2-Zell typischen Zytokinen, IL-4 und IL-10, blieb dagegen unverändert. In differenzierten Th1-Zellen zeigte sich durch den gleichen Versuch dagegen keine signifikante Veränderung der mRNA Level der Th1-Zell spezifischen Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α . Die miRNA-146a hat in primären T-Zellen somit einen hemmenden Einfluss auf die Zytokinproduktion der Th1-Zell typischen Zytokine, wogegen sie keinen Einfluss mehr auf die Zytokinproduktion in bereits differenzierten Th1-Zellen zeigt. Diese Ergebnisse deuten auf eine potentielle Regulation der Th1-Zell Aktivierung und Differenzierung durch miRNA-146a hin. Unklar war bisher, mit welchen Zielgenen die miRNA-146a interagiert und über welche Mechanismen sie ihren Einfluss nimmt.

Für eine effektive Immunantwort ist die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen essentiell. Th1-Zellen sind v.a. für die Eliminierung von intrazellulären Keimen verantwortlich [10]. Hierfür sezernieren sie inflammatorische Zytokine, unter anderem IFN- γ , TNF- α und IL-2 [6, 11]. Die erste Phase der Sepsis zeichnet sich durch eine überschießende Aktivierung von Immunzellen, vor allem Th1-Zellen aus, was zu einer übermäßigen Produktion von Zytokinen und starker Inflammation mit vermehrten Zellschäden führt [6]. Hauptaktivierungsfaktor humaner T-Zellen und damit ihrer Differenzierung und Zytokinproduktion ist die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR). Neben diesem Aktivierungsweg können Effektorzellen auch über Zytokine der IL-1 Familie zur TCR-unabhängigen Zytokinproduktion anregen. Th1-Zellen benötigen dafür IL-18 [11]. Welche Einflüsse die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen bestimmen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt [10]. Bisher konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zytokinumgebungen die Differenzierung der

Diskussion

T-Zellen in einen bestimmten Phänotyp beeinflussen. Die Th1-Zelldifferenzierung benötigt die Zytokine IL-12 und IFN- γ . Zusätzlich verstärken die effektorzellspezifischen Zytokine die eigene Differenzierung, für Th1-Zellen sind das IFN- γ , TNF- α und IL-2. Weiter ist bekannt, dass die T-Zelldifferenzierung von dem jeweiligen Muster der Transkriptionsfaktoren abhängt und damit von den transkribierten Genen bestimmt ist, die bei der T-Zell Aktivierung exprimiert werden. Dies führt zu der Produktion bestimmter Zytokine, die für die jeweiligen Effektorzellen typisch und für die Differenzierung zu diesem Zelltyp wichtig sind [11]. Für die Th1-Zelldifferenzierung sind vor allem die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 wichtig, die die Expression der Th1-Zell typischen Zytokine, IFN- γ , TNF- α und IL-2, nach sich ziehen, was bisher vor allem im Mausmodell gezeigt werden konnte [11, 24, 40]. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 wird durch IFN- γ induziert, wogegen STAT 4 durch IL-12, in Kooperation mit IL-18 auch T-Zell-Rezeptor unabhängig, aktiviert werden kann. Für beide Transkriptionsfaktoren ist *Tbx21* ein wichtiges Zielgen. Es kodiert den Transkriptionsfaktor T-bet, einen T-box Transkriptionsfaktor. T-bet wird in der frühen Phase der Differenzierung durch STAT1 exprimiert, in der späten Phase von STAT4. STAT4 induziert gemeinsam mit T-bet eine Reihe von untergeordneten Genen, die wichtig für die Th1-Zelldifferenzierung sind. Sie führen unter anderem zur Produktion von IFN- γ in T-Zellen, dem Zytokin, das als Markenzeichen der Th1-Zelldifferenzierung gilt. Gleichzeitig supprimieren sie die Gene der alternativen T-Effektorzellen [24, 40].

Die Expression von STAT1, STAT4 und T-bet steigen gleichmäßig während der Th1-Zelldifferenzierung an, mit maximalen Werten in ausdifferenzierten Th1-Zellen [41], [42], [43], [44]. Bei bestehender mangelnder Datenlage in menschlichen Zellen untersuchten wir die Expression dieser Transkriptionsfaktoren in unbehandelten CD4+ T-Zellen als auch während des Th1-Differenzierungsprozesses. Ähnlich der bekannten Expressionsprofile im Mausmodell konnte eine gleichmäßige Zunahme der STAT1 und T-bet Expression während der Th1-Differenzierung mit gleichmäßig hohen Spiegeln nach fünf Tagen gesehen werden. STAT4 zeigte dagegen eine sehr hohe Expression und Phosphorylierung zu Beginn der Th1-Differenzierung mit nachfolgendem Abfall. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der bisher unbekannt Weg, über den die miRNA-146a auf die Th1-Differenzierung Einfluss nimmt, der Transkriptionsfaktor STAT4 ist. Durch STAT4 Knock-Down mittels

Diskussion

Transfektion einer siRNA gegen STAT4 in CD4+T-Zellen und unter Th1-differenzierenden Bedingungen konnte diese Vermutung bestätigt werden. Die Expressionsspiegel der Th1-spezifischen Zytokine wurden signifikant reduziert, was dem Ergebnis nach Transfektion mit miR-146a gleicht.

Die STAT4 Expression selbst wurde in CD4+T-Zellen jedoch durch Transfektion mit miR-146a nicht beeinflusst. Es konnte jedoch eine stark verminderte STAT4 Phosphorylierung nachgewiesen werden. Zudem weist der 3'UTR von STAT4 keine miRNA-146a Bindestellen auf, so dass wir von einem indirekten Einfluss der miRNA-146a auf STAT4 ausgehen konnten. Mittels bioinformatischer Analysen [27] konnte PRKC ϵ als mögliches Bindeglied zwischen miRNA-146a und STAT4-Phosphorylierung ermittelt werden. Kürzlich konnten Aziz et al. [45] eine wichtige Rolle von PRKC Isoformen bei der Phosphorylierung von STAT-Proteinen aufklären. Durch Transfektionsexperimente konnte diese Vermutung bestätigt werden. Primäre humane T-Zellen wurden mit miR-146a, antimiR-146a oder zur Kontrolle mit der miR-NC transfiziert. Nach miR-146a Transfektion wurden eine stark reduzierte PRKC ϵ mRNA Expression sowie eine ebenfalls verminderte Proteinproduktion bestimmt. Dagegen konnte eine verstärkte PRKC ϵ Expression durch Transfektion mit antimiR-146a gemessen werden.

Dies wird auch darüber gestützt, dass sich über insilico Prädiktionsalgorithmen vier spezifische Zielsequenzen mit hoher Bindungswahrscheinlichkeit für die miRNA-146a im 3'UTR der PRKC ϵ ermitteln ließen [27]. Durch Luciferase-Reporter Versuche mit kloniertem 3'UTR der PRKC ϵ wurde diese vermutlich direkte Bindung und Interaktion der miRNA-146a an die PRKC ϵ untersucht. Kotransfektion dieses Vektors mit miR-146a in HEK-Zellen zeigte eine signifikant reduzierte Luciferase-Aktivität der PRKC ϵ im Vergleich zu einer Kontrolle. Um den Einfluss jeder einzelnen der vier vermuteten miRNA-146a Bindestellen im 3'UTR der PRKC ϵ zu untersuchen, wurde die jeweilige Bindestelle durch Punktmutation eliminiert. Die Luciferase-Aktivität jedes mutierten Reporters wurde durch miRNA-146a Überexpression im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Allerdings fiel diese Verminderung der Luciferase-Aktivität deutlich geringer aus, als beim ursprünglich unmutierten PRKC ϵ -Reporter. Vermutlich sind alle vier Bindestellen im 3'UTR der PRKC ϵ für die miRNA-146a an der Inhibition der Transkription der PRKC ϵ beteiligt und es ist ein Zusammenspiel der vier untersuchten Bindestellen verantwortlich für die gesamte inhibitorische Wirkung der miRNA-146a

Diskussion

auf die PRKC ϵ . Um die angenommene Relevanz dieser Ergebnisse in der Th1-Differenzierung zu überprüfen, wurde die Expression der miRNA-146a und der PRKC ϵ in CD4⁺T-Zellen und während der Th1-Differenzierung gemessen. Während der Th1-Differenzierung nahm die miRNA-146a Expression deutlich zu, wohingegen die Expression der PRKC ϵ wie erwartet abnahm. Diese Beobachtungen unterstützen unsere bisherigen Annahmen, dass die miRNA-146a eine relevante Funktion in der Th1-Differenzierung hat, welche über direkte Inhibition der PRKC ϵ durch Bindung an vier nachgewiesenen Bindestellen des 3'UTR der PRKC ϵ vermittelt wird.

Die PRKC ϵ gehört zu der Familie der Proteinkinase C, eine Gruppe von phospholipidabhängigen Serin/Threonin Kinasen. Sie zählt zu den neuen PRKCs, die zwar phospholipidabhängig arbeiten, aber im Gegensatz zu den konventionellen PRKCs kein Kalzium benötigen. *In vivo* Experimente zeigten, dass PRKC ϵ eine Schlüsselrolle in der Regulation von Inflammation und der Immunantwort spielt. Regulatorische Einflüsse der PRKC ϵ auf die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten konnten bereits in verschiedenen Studien an Menschen und Mäusen gezeigt werden [46-50]. Im angeborenen Immunsystem der Maus ist PRKC ϵ über die Aktivierung von IRAK1 an der Signalvermittlung des TLR-4 (toll-like receptor) beteiligt. Über die Aktivierung der NF- κ B- und MAPK-Signalwege in dendritischen Zellen wird die IL-12-Produktion gesteigert. Dies unterstützt die Th1-Zelldifferenzierung [46]. PRKC ϵ hat auch einen positiven Einfluss auf die Makrophagenfunktion [49]. Über die Beteiligung an der T-Zell-Rezeptor Signalkaskade nimmt PRKC ϵ Einfluss auf das humane adaptive Immunsystem. PRKC ϵ ist dabei über die Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren an der Regulation der IL-2 Expression beteiligt. Einerseits ermöglicht sie die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, indem die I κ B Kinase (IKK) aktiviert wird, wodurch I κ B degradiert wird. Andererseits aktiviert PRKC ϵ über pim1 den NFAT-Signalweg und ist zusätzlich an der Induktion von AP-1 beteiligt [47, 48]. Allerdings gibt es auch gegenteilige Meinungen, z.B. konnten Gruber et al. [51] im Mausmodell keine Beteiligung der PRKC ϵ an der Aktivierung von NF- κ B und damit an der T-Zell-Rezeptorkaskade finden. PRKC ϵ ist in der Maus auch wichtig für die Selektion der Lymphozyten im Thymus und am Signalweg des IL-2-Rezeptors beteiligt [49]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die PRKC ϵ wichtig für die Expandierung von aktivierten T-Helfer Zellen ist. Trotz allem ist die Rolle der PRKC ϵ in der Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten noch nicht geklärt [47, 52,

53]. Castrillo et al. konnten in Mausexperimenten außerdem zeigen, dass die PRKC ϵ essentiell für die Verteidigung des Körpers gegen Bakterien ist. Diese Eigenschaft der PRKC ϵ könnte eventuell auch für die Entstehung einer Sepsis entscheidend sein [46]. Die bisher bekannten Signalwege der PRKC ϵ und der miRNA-146a zeigen auffällige Parallelen, wie z.B. die Beeinflussung der MAP- und NF- κ B-Signalwege über IRAK1. Eine direkte Regulation der PRKC ϵ durch miRNA-146a konnte hier sowohl in primären T-Zellen als auch mittels direkter Analyse des PRKC ϵ 3'UTRs nachgewiesen werden. Die direkte Regulation der PRKC ϵ durch miRNA-146a konnte auch von Zhang et al. [54] in menschlichen papillären Schilddrüsenkarzinomzellen nachgewiesen werden. Die miRNA-146a-PRKC ϵ -Interaktion könnte somit auch im Krankheitsbild der Sepsis eine wichtige Rolle spielen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind die miRNA-146a Spiegel in T-Zellen von Sepsispatienten erniedrigt, wodurch die Degradierung der mRNA von PRKC ϵ aufgehoben wird. Folglich kommt es zur erhöhten Expression der PRKC ϵ und zur verstärkten Immunantwort. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte in T-Zellen von Sepsispatienten bei schon bekannt verminderter miRNA-146a Expression eine im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte Expression der PRKC ϵ gemessen werden. Um nun die tatsächliche Phosphorylierung und Aktivierung der STAT4 durch die PRKC ϵ und dem damit verbundenen Einfluss auf die Th1-Zelldifferenzierung zu beweisen, wurde ein STAT4-Luciferase-Reporter (Firefly) und ein unabhängiger Kontrollreporter (Renilla) zusammen mit der siRNA gegen PRKC ϵ in HEK-Zellen kotransfiziert. Die Aktivität der STAT4 wurde durch den PRKC ϵ Knock-Down im Vergleich zu einer Kontrolle signifikant reduziert. Damit konnte gezeigt werden, dass PRKC ϵ die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT4 auf Proteinebene beeinflusst.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die hier vermutete direkte Hemmung der PRKC ϵ durch die miRNA-146a und die darüber gehemmte STAT4 Aktivierung via Phosphorylierung in der Pathogenese der Sepsis eine wichtige Rolle spielt. Die in gesunden T-Zellen über die miRNA-146a supprimierte Aktivität des STAT4 zeigt sich in einer verminderten Expression der Th1-Zell typischen Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α , wodurch die Th1-Zelldifferenzierung primärer T-Zellen verhindert wird.

Diskussion

Durch die verminderten miRNA-146a-Spiegel in T-Zellen von septischen Patienten wird die Expression von PRKC ϵ enthemmt. Die erhöhten Spiegel der PRKC ϵ führen in der Sepsis über die Produktion der proinflammatorischen Th1-Zytokine IFN- γ und IL-2 einerseits zur vermehrten Th1-Zelldifferenzierung primärer T-Zellen. Des Weiteren führt eine erhöhte PRKC ϵ Aktivität zur verstärkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT4 [11, 24, 40]. Die so gesteigerte Aktivität der STAT4 führt über die verstärkte Transkription und Expression von für die Th1-Zelldifferenzierung wichtigen Genen - darunter das Th1-Zell typische Zytokin IFN- γ [11, 40] - zur verstärkten Th1-Zelldifferenzierung primärer T-Zellen. Dies fördert die Entwicklung einer unkontrollierten Th1-Zellantwort und die Ausprägung des typischen proinflammatorischen Phänotyps in der ersten Phase der Sepsis [6].

Diese direkte Regulationskette, von der verminderten miRNA-146a Expression über die vermehrte Expression der PRKC ϵ zur Aktivierung von STAT4 und ihre darüber wahrscheinliche Auswirkung auf die humane Immunantwort im Krankheitsbild der Sepsis, konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden.

Die miRNA-146a zeigt sich hier somit über die direkte Inhibition der PRKC ϵ als wichtiger Knotenpunkt in einem weitreichenden Netzwerk von Regulationsmechanismen, die die humane Th1-Zelldifferenzierung und damit die Immunantwort kontrollieren.

Da alle bisherigen Experimente *in vitro* an humanen Zellen durchgeführt wurden, steht die Bestätigung der von uns gefundenen Zusammenhänge *in vivo* noch aus und damit die Gültigkeit dieser Vorgänge im menschlichen Organismus. Diese Untersuchungen müssen Gegenstand zukünftiger, prospektiver Studien sein.

6 Ausblick

Für T-Zellen weiß man, dass die miRNA-146a Expression durch die T-Zell-Rezeptor Aktivierung über NF- κ B gesteigert wird. Es ist auch bekannt, dass die miRNA-146a in T-Zellen das Signalmolekül IRAK1 hemmt, was die Hemmung von TRAF6 nach sich zieht. Über diesen Weg wird unter anderem über eine negative Feedbackschleife wiederum NF- κ B und damit die miRNA-146a gehemmt [28]. Über die PRKC ϵ Expression in T-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie wie die miRNA-146a auch über die T-Zell-Rezeptor Aktivierung gesteigert wird [48]. Die PRKC ϵ erhöht die IL-2 Produktion über verschiedene Wege, Aktivierung von NFAT [48], AP-1 und NF- κ B [47].

Es könnte möglich sein, dass die miRNA-146a nicht nur durch ihr Ziel IRAK1 über NF- κ B im Sinne einer negativen Feedbackschleife reguliert wird, sondern zusätzlich die PRKC ϵ über eben diese NF- κ B Feedbackschleife, die miRNA-146a Expression negativ reguliert. Eventuell kommt es auch durch unsere nachgewiesene direkte Hemmung der PRKC ϵ durch die miRNA-146a in T-Zellen zu „cross-talking“, d.h. zur Koordination der verschiedenen Signalwege, in denen diese beiden Moleküle beteiligt sind.

Da die miRNA-146a viele potentielle Ziele beeinflusst, wie es die Natur von miRNAs ist, werden wahrscheinlich noch weitere, vielleicht auch noch unbekannt, für das Krankheitsgeschehen in der Sepsis wichtige Signalwege von ihr reguliert [28]. Gleichzeitig kann man neben der miRNA-146a auch andere Einflüsse auf die Überexpression von PRKC ϵ in der Sepsis nicht ausschließen. Beide Moleküle, die miRNA-146a und die PRKC ϵ , lassen noch viele Fragen offen, z.B. zu ihrer Regulation und zu ihrer Wirkung auf andere inflammatorisch beteiligte Signalwege. Außerdem bleibt auch die Ursache für die verminderte Expression der miRNA-146a in T-Zellen von septischen Patienten noch unbekannt.

Auch für andere Zellen des Immunsystems sind die miRNA-146a und die PRKC ϵ von Bedeutung. So ist für Treg-Zellen bekannt, dass die miRNA-146a die STAT1 Expression fördert, was über die IFN- γ Expression ebenfalls zur Th1-Zelldifferenzierung führt [23]. STAT1 ist für die Anfangsphase der Th1-Zelldifferenzierung wichtig [23, 24], wohingegen Transkriptionsfaktor STAT4, der, wie wir zeigen konnten, auch durch PRKC ϵ über miRNA-146a reguliert wird, für die späte

Th1-Zelldifferenzierung unerlässlich ist [24]. In Monozyten ist bekannt, dass die miRNA-146a durch bakterielle Antigene über NF- κ B erhöht exprimiert wird. Die miRNA-146a vermindert darüber die Aktivität ihres Ziels IRAK1 und damit TRAF6, was über die verminderte Aktivität des NF- κ B- und MAPK-Signalweges zur verminderten Zytokinproduktion und damit zu einer verminderten Immunantwort führt [22, 33-36]. Aus diesem Wissen folgt, dass die miRNA-146a auch im angeborenen Immunsystem eine antiinflammatorische Wirkung hat, um eine unangebrachte, überschießende Immunantwort zu verhindern. Man weiß zudem auch, dass die miRNA-146a durch den FADD-Signalweg antiapoptotisch wirkt [28].

Über die PRKC ϵ ist bekannt, dass sie in dendritischen Zellen nach der Stimulierung mit bakteriellen Antigenen im TLR-4-Signalweg beteiligt ist, was über die Aktivierung von IRAK1 und damit TRAF6 zur Aktivierung der NF- κ B- und MAPK-Signalwege zu einer vermehrten IL-12 Produktion führt und damit die Th1-Zelldifferenzierung fördert [46]. Auch in Makrophagen wird die PRKC ϵ Expression über bakterielle Antigene gefördert, was zur NF- κ B Aktivierung und IL-2 Produktion führt. Über den gesteigerten IL-2-Spiegel werden wiederum T-Zellen aktiviert, was zur T-Zelldifferenzierung in Th1- und Th2-Effektor-T-Zellen führt [49].

Es könnte gut möglich sein, dass auch in Zellen des angeborenen Immunsystems die miRNA-146a hemmend auf die PRKC ϵ und darüber auch auf schon bekannte Signalwege wirkt. Vielleicht werden schon bekannte und auch noch unbekannte Wirkungen über ihre STAT4 Hemmung erzielt. Zudem könnten die für das angeborene Immunsystem beschriebenen Wirkungen der miRNA-146a und der PRKC ϵ auch in Zellen des erworbenen Immunsystems von Bedeutung sein. Weiter könnte man postulieren, dass die verschiedenen Signalwege in Zellen des Immunsystems, an denen die miRNA-146a und die PRKC ϵ beteiligt sind, über eben diese beiden Moleküle kommunizieren und sich koordinieren. Eventuell ist daran auch das gemeinsame Ziel IRAK1 beteiligt. Es könnte sich auch herausstellen, dass die miRNA-146a an allen sonst bekannten Signalwegen, an denen die PRKC ϵ beteiligt ist, hemmenden Einfluss nimmt.

Am Beispiel der miRNA-146a und ihrem Einfluss auf PRKC ϵ kann man die komplizierten Regulationsmechanismen des Immunsystems erkennen. Es gibt viele Möglichkeiten in diesem großen Netzwerk von Signalwegen, an denen ein Fehler

Ausblick

entstehen und damit eine inflammatorische Erkrankung wie die Sepsis ausgelöst werden kann. Inwieweit der hier gefundene Regulationsmechanismus der miRNA-146a über PRKC ϵ und STAT4 an der Entwicklung anderer immunologisch vermittelter Erkrankungen beteiligt ist, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Zum Beispiel konnten Tang, Y., et al. [55] eine verminderte miRNA-146a Expression mit assoziiertem, erhöhtem INF- γ Spiegel in peripheren Lymphozyten von an Lupus erythematodes erkrankten Patienten nachweisen. Trotz aller Bemühungen bleibt der größte Anteil der miRNA-146a Regulationsmechanismen für die adaptive Immunantwort noch unbekannt [28]. Auch die Validierung bisher bekannter Mechanismen vom Mausmodell für den Menschen steht noch aus. Die miRNA-146a bleibt also ein interessantes Themengebiet für weitere Studien mit dem Ziel, die Mechanismen der Pathogenese der Sepsis aufzudecken. Das Wissen um die molekularen Vorgänge, die zur Entstehung der Sepsis beitragen, könnte in Zukunft neue Ziele für die erfolgreiche Therapie dieses meist tödlichen Krankheitsbildes liefern. Eines dieser Ziele könnte die miRNA-146a sein.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Funktion der microRNA-146a (miRNA-146a) in humanen T-Zellen und ihr Einfluss auf die dabei beteiligten Signalwege ermittelt. Zusätzlich wurde der potenzielle Einfluss der miRNA-146a auf die T-Zell Funktion im klinischen Syndrom der Sepsis untersucht. Das Krankheitsbild der Sepsis ist charakterisiert durch eine schwere bakterielle Inflammation mit unangemessener Immunantwort des Körpers.

Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass es über die direkte Hemmung der Proteinkinase C epsilon (PRKC ϵ) durch die miRNA-146a zu einer verminderten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) durch die PRKC ϵ kommt. Diese Regulationskette ist entscheidend für eine verminderte Th1-Zelldifferenzierung und damit für eine verminderte Th1-Zellantwort in humanen Lymphozyten. Die miRNA-146a hat also durch die Regulation von STAT4 über den hemmenden Einfluss auf die PRKC ϵ eine antiinflammatorische Wirkung.

Zudem konnten wir zeigen, dass miRNA-146a in der Pathogenese der Sepsis eine Rolle spielen könnte. Primäre T-Zellen von Sepsispatienten zeigten eine signifikante Verminderung der miRNA-146a in ihren T-Zellen sowie eine vermehrte Expression der PRKC ϵ während der initialen hyperinflammatorischen Phase der Erkrankung. Diese Konstellation könnte Anteil an der Entstehung der übersteigerten Th1-Zellantwort haben, die für diese Phase der Sepsis charakteristisch ist.

Das Immunsystem wird durch ein kompliziertes Netzwerk von Regulationsmechanismen kontrolliert. Ein wichtiger Knotenpunkt zur Feinabstimmung der Genexpression könnte die miRNA-146a mit ihrer hemmenden Wirkung auf die PRKC ϵ sein. Der Natur von miRNAs entsprechend, existieren vermutlich noch weitere regulatorische Ziele der miRNA-146a in anderen Signalwegen der Inflammation. Dies zu untersuchen könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

8 Summary

In this study, we have investigated microRNA-146a (miRNA-146a) driven pathways in primary human T cells and their impact on the regulation of human T cells during sepsis. The clinical syndrome of sepsis is characterized by severe inflammation with inappropriate host immune responses.

We here demonstrate for the first time that in human T cells miRNA-146a targets protein kinase C epsilon (PRKC ϵ), which phosphorylates signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) in a functional complex. STAT4, in turn, is capable of promoting Th1 cell differentiation. By targeting PRKC ϵ , miRNA-146a inhibits STAT4 via reduced STAT4 phosphorylation and transcriptional activity and therefore decreases Th1 cell differentiation and T cell response. Thus miRNA-146a is a negative regulator of human immune responses via inhibition of PRKC ϵ dependent STAT4 phosphorylation.

Furthermore, we could identify that miRNA-146a-way plays a role in the pathogenesis of sepsis. T cells of sepsis patients exhibited reduced levels of miRNA-146a and an increased PRKC ϵ expression in the initial hyperinflammatory phase of the disease. This may promote the development of an excessive Th1 response, typical for this phase in the clinical syndrome of sepsis.

The immune response is regulated through a complex network of mechanisms. Here, miRNA-146a has been characterized as an important node in fine tuning gene expression via PRKC ϵ and STAT4 in human T cells. Due to the multitargeting nature of miRNAs, more targets of miRNA-146a in other signaling pathways of inflammation may exist. Thus, miRNA-146a remains an important subject for further studies focused on the complex interactions within the regulatory networks of the immune responses, and particularly of sepsis.

9 Literaturverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden 2015 im European Journal of Immunology veröffentlicht [56].

1. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008*. Crit Care Med, 2008. **36**(1): p. 296-327.
2. Bonelli, M., *[The general theory of systems and the microcirculation]*. Clin Ter, 1992. **141**(11): p. 385-91.
3. Warren, H.S., *Strategies for the treatment of sepsis*. N Engl J Med, 1997. **336**(13): p. 952-3.
4. Skrupky, L.P., P.W. Kerby, and R.S. Hotchkiss, *Advances in the management of sepsis and the understanding of key immunologic defects*. Anesthesiology, 2011. **115**(6): p. 1349-62.
5. Galley, H.F. and N.R. Webster, *The immuno-inflammatory cascade*. Br J Anaesth, 1996. **77**(1): p. 11-6.
6. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
7. Hoser, G.A., et al., *Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: a pilot study*. Folia Histochem Cytobiol, 2012. **50**(3): p. 420-6.
8. Torgersen, C., et al., *Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis*. Anesth Analg, 2009. **108**(6): p. 1841-7.
9. Wang, T.S. and J.C. Deng, *Molecular and cellular aspects of sepsis-induced immunosuppression*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(5): p. 495-506.
10. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
11. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.

12. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
13. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
14. Boomer, J.S., et al., *Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure*. JAMA, 2011. **306**(23): p. 2594-605.
15. Sonkoly, E., M. Stahle, and A. Pivarcsi, *MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(2): p. 131-40.
16. Lindsay, M.A., *microRNAs and the immune response*. Trends Immunol, 2008. **29**(7): p. 343-51.
17. Soifer, H.S., J.J. Rossi, and P. Saetrom, *MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications*. Mol Ther, 2007. **15**(12): p. 2070-9.
18. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
19. Pedersen, I. and M. David, *MicroRNAs in the immune response*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 391-4.
20. Tsitsiou, E. and M.A. Lindsay, *microRNAs and the immune response*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 514-20.
21. Wang, J.F., et al., *Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(1): p. 184-8.
22. Boldin, M.P., et al., *miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice*. J Exp Med, 2011. **208**(6): p. 1189-201.
23. Lu, L.F., et al., *Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses*. Cell, 2010. **142**(6): p. 914-29.
24. Pham, D., et al., *Opposing roles of STAT4 and Dnmt3a in Th1 gene regulation*. J Immunol, 2013. **191**(2): p. 902-11.

25. van Rietschoten, J.G., et al., *Genomic organization of the human interleukin-12 receptor beta2-chain gene*. Immunogenetics, 2000. **51**(1): p. 30-6.
26. Koch, M.A., et al., *T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 501-10.
27. Hinske, L.C., et al., *A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 533.
28. Yang, L., et al., *miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice*. J Exp Med, 2012. **209**(9): p. 1655-70.
29. O'Connell, R.M., et al., *Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 111-22.
30. O'Connell, R.M., D.S. Rao, and D. Baltimore, *microRNA regulation of inflammatory responses*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 295-312.
31. Zhao, J.L., et al., *NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9184-9.
32. Hou, J., et al., *MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2150-8.
33. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
34. Zilahi, E., et al., *Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjogren's syndrome*. Immunol Lett, 2012. **141**(2): p. 165-8.
35. Xia, P., et al., *Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions*. Immunol Lett, 2012. **148**(2): p. 151-62.

36. Karrich, J.J., et al., *MicroRNA-146a regulates survival and maturation of human plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2013. **122**(17): p. 3001-9.
37. Pauley, K.M., et al., *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R101.
38. Quinn, E.M., et al., *MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62232.
39. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
40. Oestreich, K.J. and A.S. Weinmann, *Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 191-5.
41. Bronevetsky, Y., et al., *T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire*. J Exp Med, 2013. **210**(2): p. 417-32.
42. Rusca, N., et al., *MiR-146a and NF-kappaB1 regulate mast cell survival and T lymphocyte differentiation*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(21): p. 4432-44.
43. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
44. Zhu, J., et al., *The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses*. Immunity, 2012. **37**(4): p. 660-73.
45. Aziz, M.H., et al., *Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8828-38.
46. Aksoy, E., M. Goldman, and F. Willems, *Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 183-8.

47. Mirandola, P., et al., *Protein kinase Cepsilon regulates proliferation and cell sensitivity to TGF-1beta of CD4+ T lymphocytes: implications for Hashimoto thyroiditis*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4721-32.
48. Keenan, C., A. Long, and D. Kelleher, *Protein kinase C and T cell function*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1358**(2): p. 113-26.
49. Castrillo, A., et al., *Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1231-42.
50. Simon, A.K., et al., *The lack of NF-kappa B transactivation and PKC epsilon expression in CD4(+)CD8(+) thymocytes correlates with negative selection*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1253-62.
51. Gruber, T., et al., *Protein kinase Cepsilon is dispensable for TCR/CD3-signaling*. Mol Immunol, 2005. **42**(3): p. 305-10.
52. Basu, A. and U. Sivaprasad, *Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision*. Cell Signal, 2007. **19**(8): p. 1633-42.
53. Kwon, M.J., et al., *Protein kinase C-theta promotes Th17 differentiation via upregulation of Stat3*. J Immunol, 2012. **188**(12): p. 5887-97.
54. Zhang, X., et al., *MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development*. Int J Cancer, 2014. **134**(2): p. 257-67.
55. Tang, Y., et al., *MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p. 1065-75.
56. Mohnle, P., et al., *MicroRNA-146a controls Th1-cell differentiation of human CD4+ T lymphocytes by targeting PRKCepsilon*. Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 260-72.

10 Anhang

Im Folgenden werden alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Materialien in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Bei Firmensitz in Deutschland ist nur dieser angegeben.

10.1 Reagenzien

Sämtliche für die experimentelle Durchführung benötigten Reagenzien wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad von den entsprechenden Herstellern bezogen.

Tabelle 1: Reagenzien	
6 x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
30% Acrylamid/Bis Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose-Tabletten (0,5 g/Tablette)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Anti-beta Actin antibody [AC-15]	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-IL-4 antibodies human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Blotting-Grade Blocker (non-fat dry milk)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Anhang

Bromophenol Blue	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA (bovine serum albumin) 100X	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
Cell Lysis Buffer (10X)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors) (500X)	eBioscience, Frankfurt
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
DNA Ladder 1 kb	Promega GmbH, Mannheim
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol vergällt 70%	Apotheke Innenstadt, Universität München
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol (100%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hank'sche Lösung (HBSS) ohne Phenolrot	Apotheke Innenstadt, Universität München
Hefeextrakt Servabacteria pulverförmig	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Anhang

HISTOPAQUE®-1077 (Dichte 1,077 g/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Human IL-12; auf 300U/ml in PBS-Puffer + 1% BSA verdünnt	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Interleukin-2, human (hIL-2) recombinant (E.coli); auf 1ng/µl in PBS-Puffer + 1% BSA verdünnt	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Light Cycler® 480 Probesmaster	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
MACS® BSA Stock solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
NEAA (Non-essential amino acids)	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
New England Puffer 4 (10X)	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
Oligo-dT Primer	Qiagen GmbH, Hilden
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PBS-Puffer (pH 7,4) (phosphate buffered saline)	Apotheke Innenstadt, München
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phospho-Stat1 Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA

Anhang

Phospho-Stat4 Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	VWR International GmbH, Ismaning
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules hsa-miRNA-146a	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Control #1	Life Technologies GmbH, Darmstadt
PRKCε Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free	Merck KGaA, Darmstadt
psiCHECK™-2 Vector	Promega GmbH, Mannheim
p-STAT4-Luc, Transkriptionsfaktor Luciferase Reporter Vektor	Signosis, Inc., Santa Clara, USA
Random Hexamers	Qiagen GmbH, Hilden
Renilla reniformis, pRL-tk-LUC Luciferase Reporter Plasmid	Dr. Marcus V. Cronauer, Ulm
Restriktionsenzym PME I	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
Restriktionsenzym Xho I	New England BioLabs, Inc., Ipswich, USA
RNAseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen GmbH, Darmstadt
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Stein
siRNA ON-TARGET _{plus} Control Pool Non Targeting pool	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
siRNA ON-TARGET _{plus} SMART pool Human PRKCε	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Anhang

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Stat4 Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer 10X	Promega GmbH, Mannheim
Taq Polymerase	Jena Bioscience GmbH, Jena
Taq Polymerase 10X Reaktionspuffer	Jena Bioscience GmbH, Jena
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (pH 8,3)	5 Prime GmbH, Hamburg
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween 20	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vi-Cell Reagent Pak	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zelllinie HEK (Human Embryonic Kidney-Zellen)	LGC Standards GmbH, Wesel
Zelllinie Jurkat	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20110, USA

10.2 Assays und Kits

Tabelle 2: Assays und Kits	
Dual Glo® Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
MACS® Pan T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS® CD4+T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Anhang

mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System 100 µl Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
QuikChange® XL10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
RNAqueous RNA Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
Strata Clone™ Solo Pack® Competent Cells	Stratagene, Inc., La Jolla, USA
SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assay für hsa-miRNA-146a	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Assay für Kontrolle U47	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA
TURBO DNA-free™ Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Mannheim

10.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte	
Autoklav DE-45	Systemec GmbH, Wettengel
DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Eluator™ Vacuum Elution Device	Promega GmbH, Mannheim
E-BOX VX2 Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, Japan
Inkubationsschrank BB16CU (Zellkultur)	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubationsschrank BD 115 (Mikrobiologie)	Binder GmbH, Tuttlingen
Kompaktthermoschüttler KS 15 Control mit Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Lumat LB 9507	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikroskop Model IB	Exacta-Optech GmbH, München
Mikrozentrifuge Centrifuge 5425 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System	Merck KGaA, Darmstadt
Neon™ Pipette	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon™ Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Quadro MACS® Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Pipettierhilfe Pipetboy comfort	Integra Biosciences GmbH, Hechingen

Anhang

Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Power Pac Basic Electrophoresis Power Supply Unit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RCT basic (Magnetrührer mit Heizung)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Goettingen
Sterilwerkbank Hera Save	Heraeus Instruments, Hanau
Sub-Cell GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spectrophotometer Nano Drop 2000	Peqlab GmbH, Erlangen
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler Mastercycler pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge TGA-50	Kontron AG, Eching
Vakuumsaugpumpe BVC21	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Wasserbad SWB 25	Haake-Technik, Vreden
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Hanau

10.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	
Falcon Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter 0,2 µm, 7 bar max.	Whatman GmbH, Dassel
Handschuhe Latex, unsteril	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Handschuhe Nitril, unsteril	Cardinal Health Inc., Dublin, Amerika
Mini-Spike	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Anhang

Light Cycler® 480 Multiwell Plates	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Perfusionsspritze BD Plastipak TM 50ml	BD Drogneda, Ireland
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
Lithium-Heparin Röhrchen Monovette 9 ml	Sarstedt AG & Co, Nürnberg- Rommelsdorf
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Multifly®Set 20G Schlauch 20cm	Sarstedt AG & Co, Nürnberg- Rommelsdorf
Reagenzröhrchen 1,5 ml, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 1,5 ml, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 0,5 ml, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen 2 ml, steril	Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzröhrchen 5 ml (PS)	Sarstedt AG & Co, Nürnberg- Rommelsdorf
Reagenzröhrchen 5 ml (PP)	BD Biosciences, Bedford Massachusetts, USA
Reagenzröhrchen 13 ml	Sarstedt AG & Co, Nürnberg- Rommelsdorf
Reagenzröhrchen 0,2 ml, autoklaviert	Eppendorf, Hamburg
Stripette® 5 ml, steril	Corning, New York, Amerika
Stripette® 10 ml, steril	Corning, New York, Amerika
Stripette® 25 ml, steril	Corning, New York, Amerika
Vi-Cell™ Sample Cups Analysengefäße	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Anhang

Zellkulturflaschen CELLSTAR® mit Filter 25T	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen CELLSTAR® mit Filter 75T	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten 6-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten 12-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

10.5 Puffer und Medien

Tabelle 5: Puffer und Medien	
DMEM-Vollmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	500 ml DMEM-Medium 10% FCS (hitzeinaktiviert) 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin 1% NEAA
LB-Agar (Lysogeny Broth Agar)	5 g Trypton 5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 7,5 g Agar 500 ml ddH ₂ O
LB-Medium (Lysogeny Broth Medium)	5 g Trypton 5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 500 ml ddH ₂ O
MACS® - Puffer = Puffer A	MACS™ BSA Stock solution autoMACS™ rinsing solution (Verdünnung 1:20)

Anhang

RPMI-Vollmedium (Roswell Park Memorial Institute Medium)	500 ml RPMI-Medium 10% FCS (hitzeinaktiviert) 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin 1% HEPES
--	---

10.6 Primersequenzen

Die Primer wurden von Metabion GmbH, Martinsried bezogen.

Tabelle 6.1: PCR Primer (Polymerase Kettenreaktion)	
PRKC ϵ 3'UTR FW	5'-CTC GAG AAA CTG ACA ATG TCG CAA GAT C-3'
PRKC ϵ 3'UTR RV	5'-GTT TAA ACT TGG CAC AAT AAC GTT TAC AAT G-3'
SCB Topovektor FW	5'-CTC GAG GTC GAC GGT ATC-3'
SCB Topovektor RV	5'-GCC TCT TCG CTA TTA CGC-3'
Psicheck Primer FW	5'-CTG AGG AGT TCG CTG CCT AC-3'
Psicheck Primer RV	5'-GAG CAG ACC GAA AAG GTC AC-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut1 FW	5'-GTG TTA TTC TTT CAT TTC CAA GGG AAC TCT GTG GCT TTG TGT ATA TGT TTC CC-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut1 RV	5'-GGG AAA CAT ATA CAC AAA GCC ACA GAG TTC CCT TGG AAA TGA AAG AAT AAC AC-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut2 FW	5'-ATA GCC TTT GTT ACT AAT GAT GAC ATT CAG AAC TCT TTT GTT TTT ATT TTT TAA AAA CTC AGG-3'

Anhang

Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut2 RV	5'-CCT GAG TTT TTA AAA AAT AAA AAC AAA AGA GTT CTG AAT GTC ATC ATT AGT AAC AAA GGC TAT-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut3 FW	5'-CTC CCC ATC ATA TTC ATG TGT AAC TAC TGA ACT TTC TTC TGC TTT CTT CAC CA-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut3 RV	5'-TGG TGA AGA AAG CAG AAG AAA GTT CAG TAG TTA CAC ATG AAT ATG ATG GGG AG-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut4 FW	5'-ATG CCT CTG GCT GGT GAA GAA CTC ACA TAG GCT GAT TTA A-3'
Mutationsprimer PRKC ϵ 3'-UTR mut4 RV	5'-TTA AAT CAG CCT ATG TGA GTT CTT CAC CAG CCA GAG GCA T-3'

Tabelle 6.2: qRT-PCR Primer (Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion)

SDHA #132 FW (Kontrolle)	5'-GAG GCA GGG TTT AAT ACA GCA- 3'
SDHA #132 RV (Kontrolle)	5'-CCA GTT GTC CTC CTC CAT GT-3'
TBP #87 FW (Kontrolle)	5'-GAA CAT CAT GGA TCA GAA CAA CA-3'
TBP #87 RV (Kontrolle)	5'-ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT-3'
PRKC ϵ #22 FW	5'-ACT GCT GCT TCC AGA CCA A-3'
PRKC ϵ #22 RV	5'-GCG CTG AAT CTG AAA CAT GA-3'
IL-2 #65 FW	5'-AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG G- 3'
IL-2 #65 RV	5'-AAG TGA AAG TTT TTG CTT TGA GCT A-3'

Anhang

TNF- α #29 FW	5'-CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT-3'
TNF- α #29 RV	5'-GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA-3'
IFN- γ #21 FW	5'-GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA G-3'
IFN- γ #21 RV	5'-TTT GGA TGC TCT GGT CAT CTT-3'
IL-4 #38 FW	5'-TGC CTC ACA TTG TCA CTG C-3'
IL-4 #38 RV	5'-GCA CAT GCT AGC AGG AAG AAC-3'
IL-10 #67 FW	5'-TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA-3'
IL-10 #67 RV	5'-GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA-3'
IL-12RB2 #50 FW	5'-GGA GCA GAG ATC TTC GTT GG-3'
IL-12RB2 #50 RV	5'-CCC CTG TTC TCC CTT CTG TA-3'
STAT1 #87 FW	5'-CTG CTC CTT TGG TTG AAT CC-3'
STAT1 #87 RV	5'-GCT GAA GTT CGT ACC ACT GAG A-3'
STAT4 #67 FW	5'-TGC AAC CAA AGG AAA TGA AGT-3'
STAT4 #67 RV	5'-AAT GAA GTT CTT CAG TCA CCA TGT-3'
t-bet #72 FW	5'-TGG GTG CAG TGT GGA AAG-3'
t-bet #72 RV	5'-TCC TGT GTT GGG GGA GTC-3'

Tabelle 6.3: Sequenzierungsprimer

Psicheck 2	5'-ACC CTG GGT TCT TTT CCA AC-3'
PRKC ϵ FW	5'-AGA TGG GGG AGA GAA AGG AA-3'
PRKC ϵ RV	5'-TAC TCA ACG AAC ACG CAA GC-3'

10.7 Small interfering RNA

Die verwendete siRNA wurde von Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA bezogen.

Tabelle 7: ON-Targetplus SMARTpool siRNA	
SiRNA PRKC ϵ	GUGGAGACCUCAUGUUUCA CGGAAACACCCGUACCUUA GACGUGGACUGCACAUGA GACCAAGGACCGCCUCUUU

10.8 Universal ProbeLibrary Set, Human von Roche Diagnostics GmbH

Tabelle 8: Universal ProbeLibrary Set, Human von Roche Diagnostics GmbH	
Universal Probes Library #132 (verwendet für SDHA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #87 (verwendet für TBP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #22 (verwendet für PRKC ϵ)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #65 (verwendet für IL-2)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #38 (verwendet für IL-4)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #67 (verwendet für IL-10)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #21 (verwendet für IFN- γ)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #29 (verwendet für TNF- α)	Roche Diagnostics, Mannheim
Universal Probes Library #67 (verwendet für STAT4)	Roche Diagnostics, Mannheim

Anhang

Universal Probes Library #72 (verwendet für t-bet)	Roche Diagnostics, Mannheim
---	-----------------------------

10.9 Software

Tabelle 9: Software	
BLAST®	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Light Cycler® 480 Relative Quantification Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
NEBcutter Version 2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
Primer3 Input Version 0.4.0	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
QuikChange Primer Design	www.agilent.com/genomics/qcpd
Segal Lab	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html
TargetScanHuman 6.0	http://www.targetscan.org/
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000

10.10 Probenmaterial

Für die Gewinnung humaner T-Lymphozyten wurde venöses Blut freiwilliger, gesunder Probanden und Sepsis Patienten verwendet. Die Studie wurde mit Genehmigung der Ethikkommission der Med. Fakultät der LMU München (No.107-11) und des Universitätsklinikums Jena (No.2007-004333-42, lokal zuständige Ethikkommission des Klinikums der Universität München 2242-03/08) durchgeführt.

Weiter wurde die Zelllinie Jurkat, bezogen von American Type Culture Collection (ATCC), und die Zelllinie HEK (Human Embryonic Kidney-Zellen), bezogen von LGC Standards GmbH, verwendet.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Braunbeck, Julia Valeria

Name, Vorname

Adresse

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Bedeutung der microRNA-146a im Krankheitsbild der Sepsis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 09.12.2019

Ort, Datum

Julia Valeria Braunbeck

Unterschrift Doktorandin/Doktorand